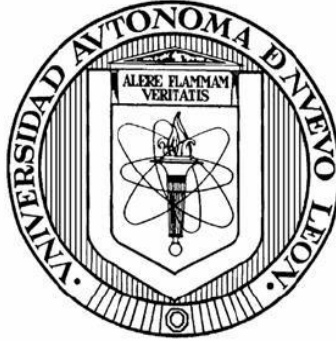


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTI-AMILOIDE DE LA AVENANTRAMIDA-
C SOBRE ALBÚMINA SÉRICA BOVINA COMO PROTEÍNA MODELO

POR

MARÍA GUADALUPE QUIROZ VÁZQUEZ

Como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN DE
BIOTECNOLOGÍA

AGOSTO, 2020

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTI-AMILOIDE
DE LA AVENANTRAMIDA-C SOBRE
ALBÚMINA SÉRICA BOVINA
COMO PROTEÍNA MODELO

Comité de Tesis

Dr. C. Azucena del Carmen González Horta
Presidente

Dr. C. Abelardo Chávez Montes
Secretario

Dra. C. Dvorak Montiel Conrado
Vocal

Dr. C. Hugo Alberto Luna Olvera
Vocal

Dr. José Ezequiel Viveros Valdez
Vocal

AGRADECIMIENTOS

A la doctora Azucena, por confiar en mí, por darme la oportunidad de ser parte del laboratorio. Gracias por su apoyo y sobre todo, por hacerme ver las cosas cuando me era imposible verlas por mí misma. Le agradezco cada consejo porque me han ayudado a ser una mejor persona y una mejor profesionista. Gracias infinitas doctora, por el apoyo que he recibido y sigo recibiendo de su parte.

A la doctoras, Dvorak y Brenda, por sus sabias preguntas y comentarios, por la ayuda recibida para la realización de este proyecto. Gracias por permitirme el uso de reactivos y equipos que sin ellos no hubiera sido posible estar hoy aquí.

Al resto de mi comité, Dr. Abelardo, Dr. Hugo, Dr. Ezequiel por la revisión y sus valiosos comentarios para concluir este escrito.

A Arely, por estar siempre al pendiente tanto de Elian como de mí. Gracias amiga por enseñarme el verdadero valor de la amistad, por darme la oportunidad de compartir contigo cada sentimiento en toda esta etapa. ¡Te quiero mucho, amiga!

A Andres, por cada almuerzo que tuvimos, por esos chilaquiles que calmaban cualquier estrés, por esas anécdotas que me entretenían muchísimo. Gracias por esas platicas en las que se podía hablar de cualquier cosa, pero sobre todo te agradezco haber sido parte del camino andado ☺.

A PAYCIT por su apoyo económico con el No. De proyecto SA758-19 el cual contribuyó parcialmente en la realización del presente trabajo.

A CONACYT por el apoyo económico durante toda esta etapa con el número de beca 607973.

DEDICATORIAS

Principalmente a Dios, por sostenerme cuando pensé que no podía más. Por demostrarme que a su lado puedo llegar a donde me proponga.

A mi ángel (Papá), por todo lo brindado, porque por él estoy aquí. A él le dedico todo lo que soy. ¡Lo amo demasiado!

A mi madre, por el apoyo, por el amor que he recibido toda mi vida. Por sus palabras alentadoras “Tranquila, le pido a Dios por ti”, cuando parece que todo se derrumba. Gracias por esas oraciones y esos abrazos que me daban una paz tremenda. ¡La amo con el alma!

A mi esposo e hijo, por ser parte de mi vida, por esos abrazos que me hacen ser una mejor versión de mí cada día. Elian quizá ahorita no entiendas mis palabras, pero te doy las gracias por ayudarme a encontrar el lado dulce de la vida, por ser mi motivación para crecer en todos los aspectos de mi vida. ¡Los amare eternamente!

A mis hermanos (Nacho, Cesar, Oscar, Fermín, José), cuñadas (Yuliana, Juany, Flor, Blanca, Gaby), sobrinos y sobrinas por su cariño y apoyo durante todo este proceso. Gracias por estar conmigo en cada momento importante de mi vida, por sus palabras que me hacían sentir orgullosa de lo que soy. Recuerden que siempre estaré para ustedes.

"*OHANA* significa familia.

Y la familia nunca te abandona, ni te olvida"

Lilo & Stitch

ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Características generales de la estructura proteica	2
2.2 Mal Plegamiento y Agregación Proteica	3
2.2.1. <i>Propagación: Transformación del Estado Nativo al Estado Amiloide</i>	5
2.2.2. <i>Fuerzas Involucradas en el Plegamiento y Agregación de Proteínas</i>	7
2.2.3. <i>Factores Responsables de la Agregación Proteica</i>	8
2.3. Citotoxicidad Causada Por Agregados Amiloides	10
2.3.1. <i>Citotoxicidad vía perturbación de membrana</i>	10
2.3.2. <i>Toxicidad debido a la desregulación de calcio y disrupción de membrana</i>	11
2.3.3. <i>Citotoxicidad vía estrés oxidativo</i>	11
2.4. Enfermedades Causadas Por Agregados Amiloides	11
2.4.1. <i>La enfermedad de Alzheimer</i>	12
2.4.2. <i>La enfermedad del Parkinson</i>	13
2.4.3. <i>La enfermedad de Huntington</i>	13
2.4.4. <i>Amiloidosis</i>	15
2.4.5. <i>Diabetes tipo 2</i>	15
2.5. Albumina Sérica Bovina	17
2.5.1. <i>Formación Amiloide de la BSA por Sonicación</i>	18
2.5.2. <i>Formación Amiloide de la BSA por Alta Temperatura</i>	20
2.6. Enfoques Terapéuticos Hacia Enfermedades Amiloides	21
2.7. Compuestos Fenólicos Naturales Como Inhibidores Amiloides	22
2.7.1. <i>Apigenina</i>	24
2.7.2. <i>Epigallocatequina -3- galato</i>	24
2.7.3. <i>Quercetina</i>	25

2.7.4.	<i>Curcumina</i>	27
2.7.5.	<i>Resveratrol</i>	28
2.7.6.	<i>Ácido rosmarinico</i>	28
2.8.	Avenantramida C	30
3.	JUSTIFICACIÓN	33
4.	HIPÓTESIS	34
5.	OBJETIVOS	35
5.1.	Objetivo general	35
5.2.	Objetivo específicos	35
6.	CAPÍTULO I	36
6.1	Resumen	36
6.2	Introducción	37
6.3	Materiales y métodos	39
6.3.1.	<i>Reactivos</i>	39
6.3.2.	<i>Formación de Agregados Amiloides</i>	39
6.3.3.	<i>Ensayo de Fluorescencia de Tioflavina T</i>	39
6.3.4.	<i>Electroforesis en Gel Nativo</i>	40
6.3.5.	<i>Análisis Estadístico</i>	40
6.4	Resultados	42
6.5	Discusión	45
7.	CAPÍTULO II	47
7.1	Resumen	47
7.2	Introducción	48
7.3	Materiales y métodos	50
7.3.1.	<i>Reactivos</i>	50
7.3.2.	<i>Inhibición de la agregación amiloide</i>	50
7.3.3.	<i>Ensayo de Fluorescencia de Tioflavina T</i>	50
7.3.4.	<i>Electroforesis en Gel Nativo</i>	51
7.3.5.	<i>Ensayo de fluorescencia de 1-anilino-8 naftaleno sulfonato (ANS)</i>	51
7.3.6.	<i>Apagamiento de la fluorescencia del triptófano</i>	52
7.3.7.	<i>Principios del apagamiento de la fluorescencia</i>	52
7.3.8.	<i>Espectroscopía por Dicroísmo Circular</i>	53

7.2	Resultados	56
7.3	Discusión	69
8.	CONCLUSIONES.....	71
9.	PERSPECTIVAS	72
10.	BIBLIOGRAFIA	73
11.	RESUMEN BIOGRÁFICO	97

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Enfermedades del sistema nervioso central y periférico causadas por agregados amiloides. Así como las proteínas asociadas a ellas y el tejido afectado.....	16
Tabla 2. Estructura de algunos flavonoles ampliamente estudios como anti-amiloides...	24
Tabla 3. Estructura de algunos no flavonoles ampliamente estudiados como anti-amiloides.....	27
Tabla 4. Porcentajes de estructura secundaria de la BSA en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de avenantramida C calculados por el método CONTIN-LL (DichroWeb).....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diferentes niveles de la estructura de una proteína.....	2
Figura 2. Diferentes estados conformacionales que puede adquirir una cadena polipeptídica.....	4
Figura 3. Las alteraciones en la estructura de la proteína durante el plegamiento pueden provocar interacciones anómalas con otras moléculas a través de la exposición de superficies hidrofóbicas.....	5
Figura 4. Proceso esquematizado de la cinética de agregación amiloide.....	6
Figura 5. Ilustración esquemática de la formación amiloide por varias empleadas en condiciones <i>in vitro</i>	9
Figura 6. Estructuras primaria y secundaria de la BSA.....	18
Figura 7. Representación esquemática del proceso de agregación por sonicación.....	19
Figura 8. Representación esquemática del proceso de agregación por alta temperatura.....	21
Figura 9. Representación esquemática que muestra los intermediarios de una vía de agregación amiloide genérica (monómeros, oligómeros, proto fibrillas y fibrillas).....	22

Figura 10. Estructura química de las avenantramidas más abundantes encontradas en el grano de la avena.....	30
Figura 11. Estructura química de la Avn-C y del fármaco sintético usado como tratamiento para algunas alergias, tranilast.....	32
Figura 12. Diagrama de flujo de la metodología empleada de la estandarización de las condiciones experimentales para la formación del agregado amiloide.....	41
Figura 13. Espectros de emisión de fluorescencia de BSA tratada mediante sonicación y alta temperatura.....	43
Figura 14. Electroforesis en gel nativo de poliacrilamida al 30% teñido con azul de Coomassie.....	44
Figura 16. Perfil de agregación de la BSA monitoreada usando el ensayo de fluorescencia de la ThT.....	57
Figura 17. Inhibición de la formación de amiloide BSA en presencia de Avenantramida-C monitorizada usando fluorescencia ThT.....	59
Figura 18. Inhibición de la formación amiloide de la BSA en presencia de curcumina y EGCG monitoreada usando el ensayo de fluorescencia de la ThT.....	60
Figura 19. La Avn-C no perturba las señales de fluorescencia de la ThT.....	61
Figura 20. Electroforesis en gel nativo de poliacrilamida de BSA antes y después de la agregación por calor en ausencia y en presencia de Avn-C.....	62
Figura 21. Cambios en la estructura secundaria de la BSA monitoreados por DC en el UV lejano.....	63

Figura 22. Ensayo de fluorescencia del ANS.....	65
Figura 23. El apagamiento de la fluorescencia de la BSA por Avn-C.....	66
Figura 24. Grafica de Stern-Volmer para las interacciones de BSA-Avn C.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS

DCP: Desordenes de Conformación Proteica

BSA: Albúmina Sérica Bovina

Avn-C : Avenantramida C

ThT : Tioflavina T

DC : Dicroísmo circular

EGCG : Epigallocatequina-3-galato

SNC : Sistema Nervioso Central

PrP^{sc} : Proteína Priónica mal plegada

SAA : Proteína Sérica Amiloide

EA: Enfermedad del Alzheimer

EP: Enfermedad del Parkinson

APP: Proteína Precursora Amiloide

LB: Cuerpos de Lewy

TSE: Encefalopatías Espongiformes Transmisibles

VPSPr: Prionopatía Variable Sensible a Proteasa

IAPP: Polipéptido Amiloide de los Islotes

HSA: Albúmina Sérica Humana

DPPH: 2, 2-difenil-1-picrylhydrazyl

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno

MetOH: Metanol

Nm: Nanómetros

PSA: Persulfato de Amonio

ANS: 1-anilino-8 naftaleno sulfonato

F₀ : Intensidad de Fluorescencia Antes de la Adición del Apagador

F: Intensidad de Fluorescencia Después de la Adición del Apagador

[Q]: Concentración del Apagador

K_q: Constante de Apagamiento Bimolecular

τ₀: Tiempo de Vida Promedio del Fluoróforo

K_a: Constante de Unión

UV: Ultravioleta

RESUMEN

Los desórdenes de conformación proteica (DCP) se caracterizan por un plegamiento anormal de proteínas que lleva a la formación, deposición y acumulación de agregados proteicos de tipo amiloides en órganos específicos. Dichas cadenas polipeptídica adquieren una conformación en lámina beta. Sin embargo, otras proteínas como la albumina sérica bovina (BSA) pueden adquirir este tipo de conformación mediante condiciones que desestabilicen su estado nativo. Debido a la citotoxicidad ocasionada por estos agregados, existe un enorme interés en encontrar compuestos que inhiban la agregación proteica. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue estandarizar las condiciones para la agregación de la BSA, así como evaluar el efecto de la avenantramida C (Avn-C) sobre dicha agregación. Para la estandarización se evaluaron dos métodos; sonicación y alta temperatura y se monitoreo por el ensayo de fluorescencia de Tioflavina T (ThT), comprobándose mediante gel de electroforesis nativo. Para evaluar el efecto inhibitorio de la Avn-C sobre la agregación, la formación de agregados se llevó a cabo mediante alta temperatura y se analizaron los agregados ricos en lámina beta de BSA mediante técnicas de espectroscopía tales como ensayo de fluorescencia de la ThT y dicroísmo circular (DC). Los resultados indican que la Avn-C muestra un mayor efecto inhibitorio a concentraciones micromolares sobre la oligomerización de la BSA en comparación con el Epigallocatequina-3-galato (EGCG) y la curcumina, demostrando que la Avn-C puede servir como una molécula potencial para prevenir la agregación proteica.

ABSTRACT

Protein conformation disorders (PCD) are characterized by abnormal protein folding that leads to the formation, deposition, and accumulation of amyloid-like protein aggregates in specific organs. These polypeptide chains acquire a beta-sheet conformation. However, other proteins such as bovine serum albumin (BSA) can acquire this conformation through conditions that destabilize their native state. Due to the cytotoxicity caused by the aggregates, there is an enormous interest in finding compounds that inhibit protein aggregation. In this work we standardized the conditions for the aggregation of BSA, as well as to evaluate the effect of avenanthramide C (Avn-C) on protein aggregation. Two methods were evaluated for standardization; sonication and high temperature and it was monitored by the Thioflavin T fluorescence (ThT) and verified by native electrophoresis gel. To evaluate the inhibitory effect of Avn-C on aggregation, the formation of aggregates was carried out by high temperature and the beta-sheet-rich aggregates of BSA were analyzed using spectroscopy techniques such as ThT fluorescence assay and dichroism circular (DC). Our results demonstrated that Avn-C shows higher inhibitory effect on the oligomerization of BSA at micromolar concentrations, than EGCG and curcumin, proving that Avn-C can serve as a potential molecule to prevent protein aggregation.

1. INTRODUCCIÓN

Los desórdenes de conformación proteica o proteinopatías son un grupo de enfermedades caracterizadas por un plegamiento proteico alternativo que lleva a la formación, deposición y acumulación de agregados tóxicos (Moreno-Gonzalez & Soto, 2011; Soto, 2003). Cada tipo de agregado proteico es específico de una enfermedad, que puede ocurrir a nivel del sistema nervioso central (SNC) o periférico. Los agregados del péptido beta amiloide y la proteína Tau son característicos de la enfermedad del Alzheimer (Duyckaerts, Delatour, & Potier, 2009), mientras que la alfa sinucleína es la protagonista en la enfermedad del Parkinson (Kalia & Lang, 2015). Todas las enfermedades priónicas o encefalopatías espongiformes transmisibles presentan agregados de la proteína priónica mal plegada (PrP^{sc}) (Hetz & Soto, 2003). Mientras que la enfermedad de Huntington se caracteriza por la acumulación de la proteína huntingtina (Ross & Tabrizi, 2011). Entre las enfermedades periféricas están la amiloidosis AA que es caracterizada por la deposición anormal de la proteína sérica amiloide (SAA) en el hígado, bazo y riñón (Westermarck, Fändrich, & Westermarck, 2015). En la diabetes tipo 2, el polipéptido amiloide de los islotes se deposita en las células beta pancreáticas (Mukherjee, Morales-Scheihing, Butler, & Soto, 2015). A pesar de que diferentes proteínas son responsables de cada enfermedad, todas ellas comparten propiedades fisicoquímicas y estructurales. Agregados estructuralmente similares pueden ser formados por proteínas y péptidos relacionados y no relacionados con enfermedades. Debido a estas similitudes estructurales, es probable que existan inhibidores genéricos de la formación amiloide. Algunos alimentos funcionales que contienen cantidades significativas de compuestos bioactivos, como los polifenoles, juegan un papel importante en la prevención de enfermedades tipo amiloides. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue estandarizar las condiciones para la formación de agregados de la BSA como proteína modelo, y posteriormente evaluar el efecto de la Avn-C, un compuesto polifenólico de bajo peso molecular que se encuentra en la *avena sativa* sobre los agregados de BSA.

2. ANTECEDENTES

2.1 Características generales de la estructura proteica

Las proteínas son las macromoléculas más abundantes en la célula, las cuales están involucradas en muchas funciones (Lodish et al. 2000). Cada proteína esta compuesta por una combinación de aminoácidos diferentes la cual define su estructura primaria. Específicamente, las moléculas de ADN almacenan la información genética que es traducida a través de moléculas de ARN (ARN mensajero) en aminoácidos, que posteriormente, durante el proceso de síntesis son ensamblados en la maquinaria de ribosomas en una combinación lineal para formar la cadena polipeptídica (Crick 1970).

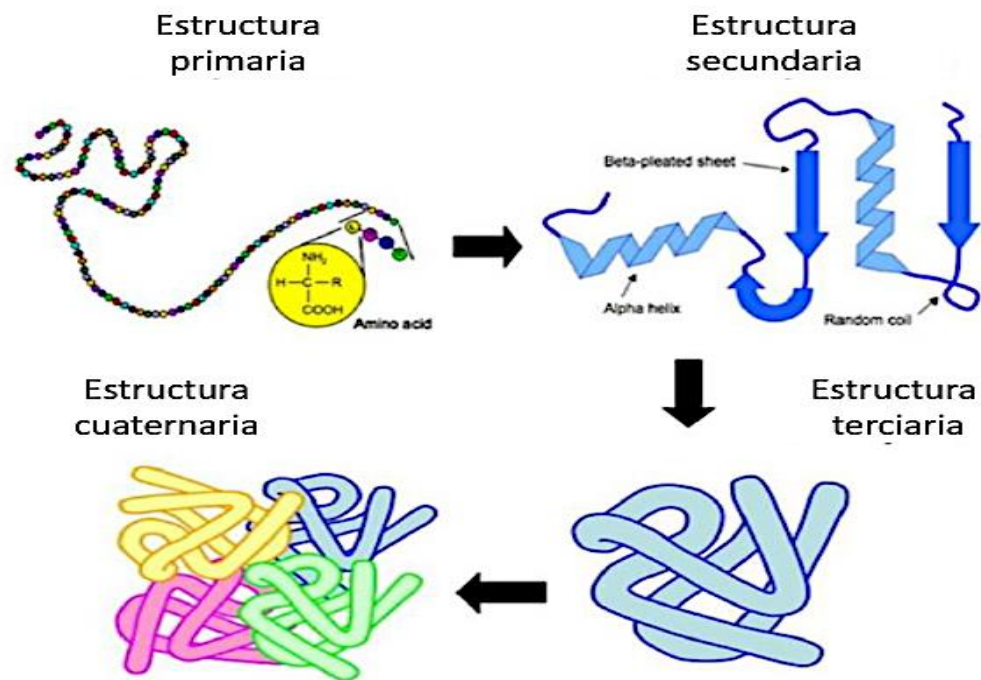


Figura 1. Diferentes niveles de la estructura de una proteína. Los niveles abarcan desde la cadena polipeptídica hasta la conformación funcional. Adaptado de Aut, 2015.

En la naturaleza existen 20 aminoácidos estándar, que son clasificados de acuerdo con sus cadenas laterales las cuales les confieren distintas propiedades químicas y físicas. La estructura secundaria es constituida por elementos ordenados, principalmente por estructura alfa hélice y lámina beta, sin embargo, también pueden adquirir conformaciones aleatorias sin una estructura regular preferida. La estructura terciaria corresponde a la distribución espacial de la estructura secundaria en la proteína. La principal fuerza que estabiliza la estructura terciaria es la interacción hidrofóbica entre las cadenas laterales no polares en el núcleo de la proteína. Finalmente, la estructura cuaternaria surge de subunidades individuales con una estructura terciaria en un complejo multimérico (Creighton 1990) (Figura 1).

2.2 Mal Plegamiento y Agregación Proteica

Las proteínas son macromoléculas que deben adquirir un plegamiento adecuado para llevar a cabo su función, como se mencionó anteriormente, este plegamiento depende tanto de su secuencia aminoacídica como de la maquinaria presente en la célula. Sin embargo, antes de adquirir una conformación activa, las proteínas pasan por varias estructuras intermedias, en donde alguno de estos intermedios puede ser más susceptible a formar conformaciones mal plegadas (conocido como protein misfolding), un problema atribuido al ambiente celular (Ellis & Minton, 2006). Por otra parte, diversas situaciones de estrés en el ambiente intracelular o extracelular (como alta concentración de proteína presente, mutaciones, interacciones con ligandos, temperatura, pH, fuerza iónica y muchos otros factores) también pueden llevar a las proteínas nativas a formar conformaciones mal plegadas (Dobson CM., 2003; Mahler et al. 2009; Duran-Aniotz, Moreno-Gonzalez, & Morales, 2013). Ese mal plegamiento puede llevar a la pérdida de las funciones fisiológicas de la proteína o hacer que las cadenas polipeptídicas adquieran conformaciones tóxicas conocidas como agregados amiloides los cuales interactúan de manera inadecuada con otros componentes celulares, perjudicando la viabilidad celular (Stefani & Rigacci, 2013) (Figura 2).

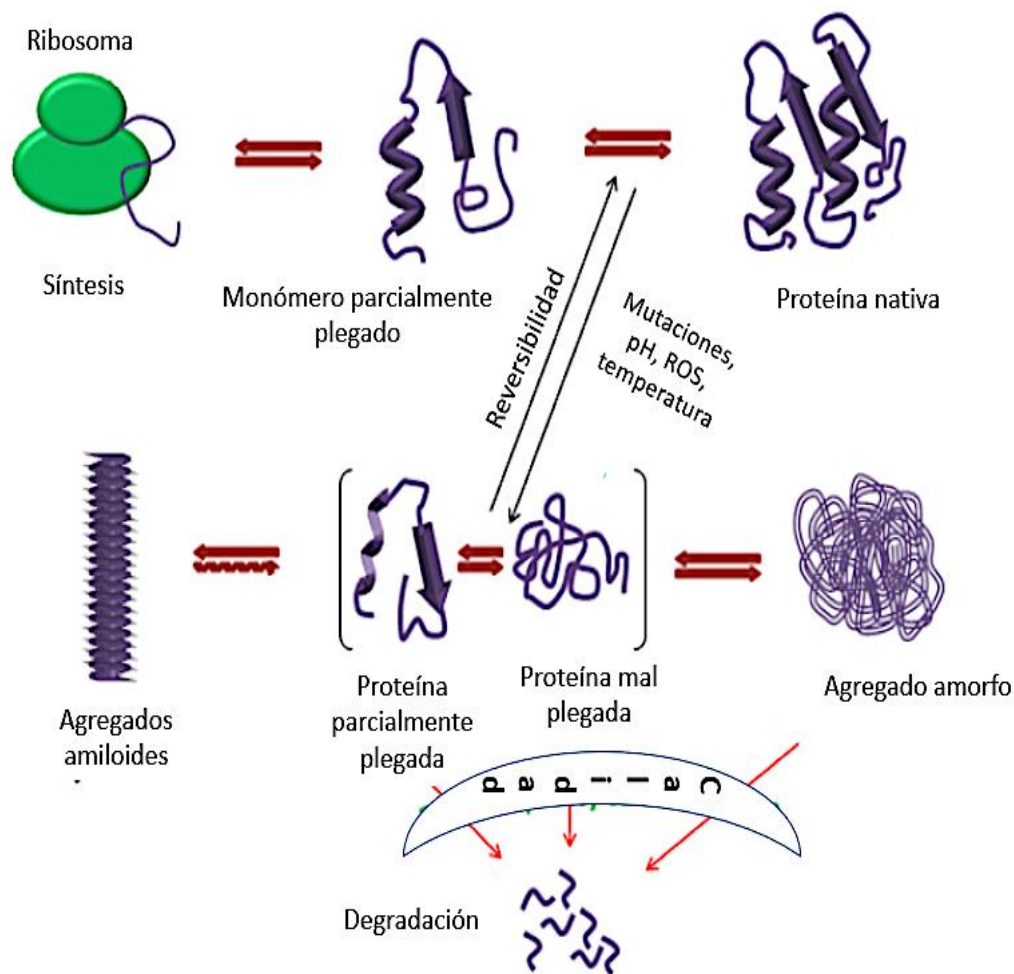


Figura 2. Diferentes estados conformacionales que puede adquirir una cadena polipeptídica. Adaptado de On et al., 2018.

Sorprendentemente, las conformaciones mal plegadas tienen cadenas laterales de aminoácidos hidrofóbicos expuestos en la superficie en lugar de estar en el interior como en el caso de las proteínas plegadas de forma nativa (Khan et al., 2013). Tal exposición de residuos hidrofóbicos proporciona la oportunidad para que estas conformaciones interactúen con otras moléculas, especialmente a través de interacciones hidrofóbicas, lo que lleva a la formación de agregados proteicos (Figura 3). La agregación de proteínas es un proceso de autoensamblaje en el que las moléculas con conformaciones alteradas mal plegadas o parcialmente desplegadas se asocian de manera específica para formar una estructura de orden

superior con baja solubilidad. Estas estructuras son conocidas como fibras amiloides (Chiti & Dobson, 2017; Eisenberg & Sawaya, 2017; Martial, Lefèvre, & Auger, 2018). Durante la agregación, una especie puede influenciar la agregación de otra y curiosamente, diferentes especies de proteínas también pueden agregarse (Rajan, Illing, Bence, & Kopito, 2001).

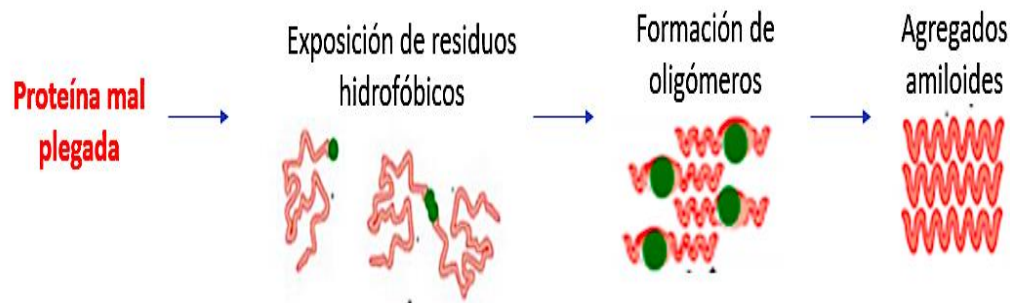


Figura 3. Las alteraciones en la estructura de la proteína durante el plegamiento pueden provocar interacciones anómalas con otras moléculas a través de la exposición de superficies hidrofóbicas. Adaptado de Díaz-Villanueva, Díaz-Molina, & García-González, 2015.

Desde un enfoque estructural, los agregados amiloides son estructuras altamente ordenadas que se caracterizan por presentar una estructura secundaria de tipo lámina beta, formada por múltiples copias de un segmento peptídico, procedentes de diferentes moléculas de la misma proteína las cuales se ensamblan formando dicha estructura. Esta disposición conformacional, les confiere a las proteínas alta estabilidad a cambios físicos y químicos, siendo el estado amiloide el más estable, en términos termodinámicos que puede adoptar una cadena polipeptídica (Baldwin et al., 2011).

2.2.1. *Propagación: Transformación del Estado Nativo al Estado Amiloide*

La formación de amiloides obedece a una reacción de polimerización nucleada por condensación no covalente, la cual se basa principalmente en la formación de un núcleo inicial de una proteína mal plegada que actúa como molde para

promover la transición de las formas solubles normales de la misma hacia la forma ensamblada en lámina beta lo que se conoce como transmisibilidad molecular (Eichner & Radford, 2011; Harper & Lansbury, 1997).

Debido a que el monómero nativo por sí solo no puede iniciar el proceso de formación de fibras, el ensamblaje amiloide requiere, en general, un desplegamiento parcial de la proteína con el fin de exponer residuos con potencial amiloidogénico, no accesibles al solvente al encontrarse formando parte de alfa hélices o localizados en el interior del núcleo de la proteína plegada (Giraldo, 2010). Existen diferentes factores capaces de mediar este desplegamiento *in vitro*, como son: el pH, presiones y temperaturas elevadas, o soluciones concentradas de agentes desnaturalizantes y caotrópicos.

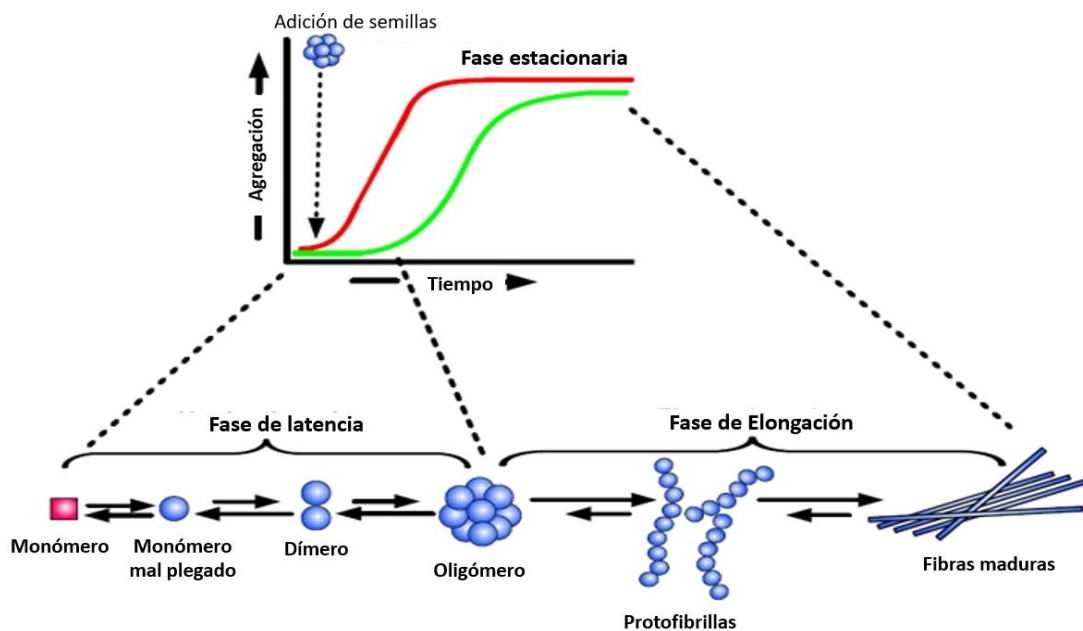


Figura 4. Proceso esquematizado de la cinética de agregación amiloide, la cual consta de varias etapas, una denominada nucleación donde los primeros monómeros con estructura alfa hélice cambian a beta plegada reclutando e induciendo nuevos monómeros los cuales en la etapa de elongación aumentan su longitud culminando en la formación de las fibrillas. Adaptado de Kumar & Walter, 2011.

Según modelos experimentales basados en medidas espectroscópicas, la cinética de ensamblaje amiloide se ajusta a una curva sigmoideal (Andersen et al., 2009; Frieden, 2007), en la que se distinguen tres fases:

1. Una fase inicial lenta, conocida como fase de latencia, en la cual se produce el proceso de nucleación, es decir, la conversión conformacional de la proteína nativa, que conlleva a la formación de pequeños oligómeros, una vez constituido el núcleo o administrado exógenamente se dispara la siguiente fase.
2. Segunda fase de crecimiento o elongación (parte exponencial de la curva), en la cual se añaden sucesivamente nuevos oligómeros a los agregados preformados. Esta etapa es compleja y el límite de crecimiento viene impuesto por la estabilidad de polímero que puede alcanzar un equilibrio de crecimiento/disociación o sufrir fragmentaciones que generen nuevas regiones de crecimiento o incapaces de crecer.
3. La fase de elongación concluye en una fase estacionaria, en la que se alcanza el equilibrio entre crecimiento y fraccionamiento (Figura 4).

2.2.2. Fuerzas Involucradas en el Plegamiento y Agregación de Proteínas

Todos estamos familiarizados con el proceso de cómo el polipéptido logra una conformación de proteína nativa que es funcionalmente activa a través del proceso de plegamiento de proteínas. Pero durante el plegamiento, los residuos de aminoácidos que están muy separados en la cadena polipeptídica se unen (Hartl, Bracher, & Hayer-Hartl, 2011), esta proximidad de residuos aminoacídicos implica diferentes interacciones intramoleculares que favorecen el plegamiento proteico, estas interacciones juegan su papel de manera regulada eficientemente. Sin embargo, la alteración de cualquiera de estas conduce a varias asociaciones no deseadas de los residuos aminoacídicos y , a su vez, da

como resultado la formación de varias proteínas parcialmente desplegadas o mal plegadas (Kim, Hipp, Bracher, Hayer-Hartl, & Ulrich Hartl, 2013). Esta alteración en las interacciones no solo lleva a proteínas mal plegadas, si no, también proporciona la oportunidad de que conformaciones alteradas pueda interactuar con otras proteínas a través de interacciones intermoleculares, llevando a la formación de oligómeros y si la adición continua dará como resultado agregados oligoméricos de orden superior. Dentro de estas interacciones están los enlaces de hidrogeno, interacciones hidrofóbicas, interacciones de Van der Waals, interacciones electrostáticas entre otras (Kim et al., 2013). En la agregación proteica, estas interacciones juegan un papel importante y no es sorprendente que una gran parte del trabajo de investigación en este campo se dedique a la inhibición de estas (Fitzpatrick, Knowles, Waudby, Vendruscolo, & Dobson, 2011).

2.2.3. Factores Responsables de la Agregación Proteica

La agregación proteica puede ser inducida por una amplia variedad de factores ambientales. Los parámetros físicos tales como temperatura (Wang 1999), pH (Elgersma et al., 2014), cosolventes (Dzwolak et al., 2005), metales iónicos (Hane, Tran, Attwood, & Leonenko, 2013), agitación (Mahler, Müller, Frieß, Delille, & Matheus, 2005), surfactantes (Khan et al., 2014), entre otros, tienen potencial para desplegar parcialmente las proteínas o incrementar su propensión hacia la formación de intermediarios plegados llevando a la agregación proteica (Figura 5).

A medida que comienza la síntesis de proteínas, un numero de chaperonas trabaja para plegar el polipéptido adecuadamente y hacerlo funcionalmente activo. Debido a que las funciones de las chaperonas son específicas de la secuencia aminoacídica, cualquier cambio o mutación en la cadena polipeptídica puede evitar su unión y función. Esta inhabilidad de las chaperonas lleva a un

plegamiento impropio de la proteína y por consecuencia resulta en una conformación que es más propensa a la agregación (Chiti & Dobson, 2006).

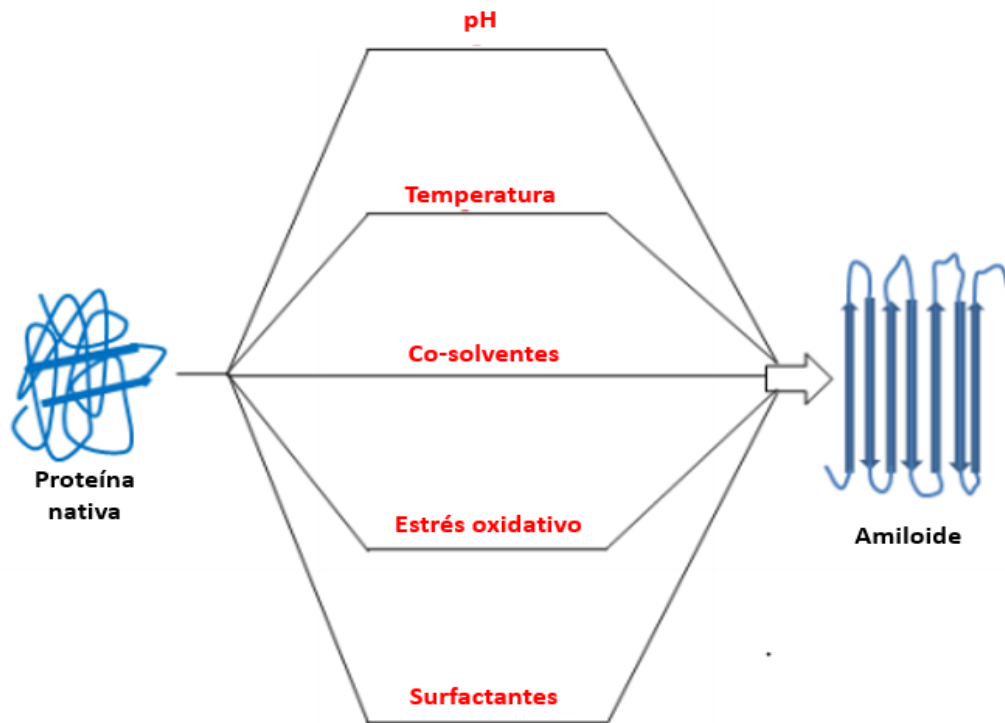


Figura 5. Ilustración esquemática de la formación amiloide por varias empleadas en condiciones *in vitro*.

Durante el envejecimiento, la habilidad del proteasoma celular para eliminar proteínas mal plegadas se ve reducida. Estas proteínas tienden a producir agregados que resultan en consecuencias fatales. Formas mutantes de la superóxido dismutasa 1 humana tienen más superficies hidrofóbicas expuestas y por lo tanto se unen más chaperonas, lo que representa la situación en la que no se mantiene la homeostasis proteica (Münch & Bertolotti, 2010).

Dado a que los agregados amiloides son capaces de interactuar con otros componentes celulares, se considera que pueden ser tóxicos y perjudicar la viabilidad celular.

2.3. Citotoxicidad Causada Por Agregados Amiloides

Estos procesos de mal plegamiento y autoensamblaje de las proteínas amiloides usualmente ocasionan citotoxicidad, la cual puede ser causada por diferentes mecanismos. Los modelos actuales se dividen en dos categorías principales que incluyen el efecto directo e indirecto de los agregados amiloides en los mecanismos celulares que finalmente conducen a la muerte celular. Los efectos directos sugeridos son la formación de poros en las membranas celulares y los efectos de permeación que lleva a la inestabilidad de las membranas, sin embargo, anormalidades en los sistemas redox, pérdida de función proteica debido a la agregación e incremento en la formación de especies reactivas de oxígeno son algunos de los modelos que se consideran efectos indirectos en el mecanismo celular de la célula (Prasad, Bharathi, Sivalingam, Girdhar, & Patel, 2019).

2.3.1. Citotoxicidad vía perturbación de membrana

Muchos agregados amiloides son capaces de interactuar con membranas lipídicas y pueden inducir a su permeabilización. El modelo más aceptado dentro de este mecanismo es la formación de estructuras tipo poro en la membrana tal como lo hacen algunos péptidos encontrados en venenos, secreciones antimicrobianas, toxinas bacterianas y perforinas (Stefani & Dobson, 2003). Varias investigaciones han reportado la presencia de poros discretos en las membranas celulares formados por el péptido beta amiloide, alfa sinucleína y proteínas ricas en poli glutamina (Arispe, Rojas, & Pollard, 1993; Nelson Arispe, Pollard, & Rojas, 1994; Hirakura, Azimov, Azimova, & Kagan, 2000). Así mismo, la adición de oligómeros a vesículas fosfolipídicas produce la liberación de fluoróforos encapsulados en su interior, indicando la permeabilización de membrana (Anguiano, Nowak, & Lansbury, 2002; Glabe, 2006). El efecto de la formación tipo poro es una pérdida de potencial de membrana, así como la pérdida de solutos que resultan en la muerte celular.

2.3.2. Toxicidad debido a la desregulación de calcio y disrupción de membrana

Existe gran evidencia que implica que elevada concentración de Ca^{2+} y la alteración de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en varias enfermedades amiloidogénicas provocan apoptosis y/o hiperfosforilación de proteínas clave que guían a la muerte celular (Demuro et al., 2005). Se ha demostrado que agregados prefibrilares elevan el Ca^{2+} citosólico en neuronas (Bucciantini et al., 2004).

2.3.3. Citotoxicidad vía estrés oxidativo

La formación de amiloides puede aumentar la acumulación de peróxido de hidrógeno en las células lo cual resulta en la peroxidación lipídica inducida por radicales libres seguido por la muerte celular. Mediante el uso de varias líneas celulares, se ha demostrado que varios antioxidantes protegen a las células de citotoxicidad causada por el péptido beta amiloide, sugiriendo que el daño por radicales libres es una de las posibles vías de citotoxicidad por este péptido. Se ha reportado que la enzima catalasa y algunos antioxidantes como vitaminas protegen de la toxicidad por dicho péptido (Schubert et al., 1995).

Debido a estos mecanismos de citotoxicidad que pueden ser generados por agregados proteicos, no es sorprendente que exista una gran cantidad de enfermedades acompañadas de agregados amiloides en diferentes órganos (Dovidchenko, Leonova, & Galzitskaya, 2014).

2.4. Enfermedades Causadas Por Agregados Amiloides

Los desórdenes causados por el mal plegamiento de proteínas o proteinopatías son un grupo de enfermedades caracterizados por un plegamiento alternativo proteico que lleva a la formación, deposición y acumulación de agregados mal plegados tóxicos (Moreno-Gonzalez & Soto, 2011; Soto, 2003). Los polipéptidos

involucrados en este tipo de enfermedades pueden incluir proteínas de longitud completa, péptidos biológicos o fragmentos de péptidos, generalmente, estos polipéptidos agregados muestran secuencias nativas en las formas esporádicas de las enfermedades; sin embargo, en varios casos, estas cadenas polipeptídicas también pueden tener variaciones resultantes de mutaciones genéticas las cuales están asociadas con formas familiares de la enfermedad (Stefani & Rigacci, 2013).

Cada tipo de agregado proteico es específico de una enfermedad, esto puede ocurrir a nivel del sistema nervioso central (SNC) entre las que se encuentran la enfermedad de Alzheimer (EA), Parkinson (EP), Huntington, y las encefalopatías espongiiformes o priónicas y a nivel del sistema periférico incluyendo la diabetes tipo 2 y la amiloidosis entre las enfermedades más comunes.

2.4.1. La enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la enfermedad neurodegenerativa más común (Wang, Gu, Masters, & Wang, 2017), se trata de un trastorno de demencia de inicio tardío con pérdida de memoria progresiva, desempeño de actividades, lenguaje y reconocimiento de personas y objetos. Existe una pérdida neuronal irreversible particularmente en el prosencéfalo e hipocampo. Esta enfermedad involucra dos tipos principales de agregados proteicos. Los agregados extracelulares son conocidos como placas neuríticas en las cuales el componente principal es el péptido beta amiloide, el cual es derivado del procesamiento proteolítico de la proteína precursora amiloide (APP). Los otros tipos de agregados involucrados en la EA son intracelulares conocidos como enredos neurofibrilares y están compuestos de la proteína Tau asociada a microtúbulos (Khanahmadi, Farhud, & Malmir, 2015; Ross & Poirier, 2004). En la actualidad, 5. millones de personas en Estados Unidos se han visto afectados con la enfermedad, sin embargo, se espera que para el 2050 la cifra se incremente a 13.8 millones (Alzheimer's, 2018; Association, 2010).

2.4.2. *La enfermedad del Parkinson*

La enfermedad del Parkinson (EP) es la segunda más común enfermedad neurodegenerativa después de la EA asociada a la edad que afecta entre 0.5 a 4% de la población a nivel mundial mayor de 65 años (Caruana & Vassallo, 2015). A nivel fisiológico, la causa de la enfermedad es la severa pérdida de neuronas dopaminérgicas y la formación de inclusiones intracelulares llamadas cuerpos de Lewy (LB) y neuritas de Lewy especialmente en la sustancia *nigra pars compacta* (Luk et al., 2012; Smith et al., 2005) esto conlleva al decremento de niveles de dopamina, causando síntomas como temblores, rigidez muscular y bradicinesia (Lim, Dawson, & Dawson, 2006; Siderowf & Stern, 2003; Warner et al., 2003). Aunque el mecanismo preciso de la enfermedad se encuentra en debate, estudios bioquímicos, histológicos y genéticos han implicado a una proteína neuronal propensa a un mal plegamiento y agregación, la alfa sinucleína (Angot et al., 2012), en la patogénesis de esta enfermedad ya que es el componente principal de los LB característicos en los pacientes con Parkinson (Moore, West, Dawson, & Dawson, 2005; Uversky, 2007). Además se ha reportado que esta proteína puede actuar de manera similar a los priones. Se ha demostrado que tejido embrionario injertado en el cerebro de enfermos de Parkinson adquiere con el tiempo cuerpos de Lewi (J. Y. Li et al., 2008) que se transmiten mediante exo y endocitosis (H. J. Lee, Patel, & Lee, 2005; H. J. Lee et al., 2008), propagando así de célula a célula el estado amiloide (Aguzzi & Rajendran, 2009).

2.4.3. *La enfermedad de Huntington*

La enfermedad de Huntington (EH) es un desorden neurodegenerativo progresivo que se caracteriza por la aparición de movimientos descontrolados, problemas emocionales la pérdida de la capacidad de pensamiento (cognición). A nivel molecular, la causa de la enfermedad se debe a mutaciones en el gen HTT el cual codifica para la proteína huntingtina. La mutación del gen involucra el

aumento del número de repeticiones de un segmento de DNA conocido como tripletes CAG el cual codifica el aminoácido glutamina, normalmente, la huntingtina presenta hasta 35 residuos de glutamina en el extremo N-terminal, mientras que la forma mutante muestra 38 o más residuos y forma agregados cuya translocación hacia el núcleo parece ser un hecho crítico que induce la muerte neuronal por apoptosis (J. Fernandes Leite, 2001; Ross & Poirier, 2004).

Los depósitos amiloides de la proteína PrP, son los responsables del desarrollo de las encefalopatías espongiformes transmisibles (TSEs) o enfermedades priónicas (Chesebro, 2003; Prusiner, 1982). Estas incluyen las enfermedades de Creutzfeldt-Jakob y Gerstmann-Sträussler-Scheinker, el insomnio familiar fatal, el kuru y la prionopatía variable sensible a proteasa (VPSPr) en humanos (Zou et al., 2010). Estas enfermedades pueden ser esporádicas o adquiridas ya sea por transmisión ambiental o por mutaciones genéticas. Los factores de transmisión ambientales pueden incluir la ingesta de partículas priónicas derivadas de tejidos cerebrales infectados o implantes quirúrgicos con instrumentos infectados. Como se mencionó también pueden ser causadas por factores genéticos como mutaciones puntuales en el gen PRNP lo cual causa alteraciones en la proteína codificada, proteína priónica, estas alteraciones dan como resultado un plegamiento anormal de la proteína. La base molecular reside en la conversión postraducciona de la proteína PrP celular (PrP^c), en una isoforma resistente a proteasas PrP^{sc}. Los agregados amiloides de PrP^{sc} se depositan extracelularmente en el cerebro (Prusiner, 1982, 1998) produciendo inflamación, muerte celular y degeneración espongiforme. Aunque ambas isoformas presentan la misma secuencia de aminoácidos y comparten las mismas modificaciones postraduccionales, sus propiedades bioquímicas son radicalmente distintas. A nivel fisiológico se ha demostrado que existe la presencia de placas amiloides similares a la encontradas en la enfermedad del Alzheimer (Ross & Poirier, 2004).

Como se mencionó anteriormente, las amiloidosis pueden, así mismo, presentarse de manera sistémica, afectando distintos órganos y tejidos. Entre estas enfermedades destacan:

2.4.4. Amiloidosis

La amiloidosis asociada a la inflamación que es caracterizada por una deposición anormal de la proteína amiloide A sérica insoluble en el hígado, bazo y riñón (Westermarck et al., 2015).

2.4.5. Diabetes tipo 2

En la diabetes tipo 2, agregados del polipéptido amiloide de los islotes (IAPP o amilina) son depositados en las células beta pancreáticas de los individuos afectados (Mukherjee et al., 2015).

Se ha reportado diafonía entre las enfermedades amiloides. Por ejemplo, los pacientes con diabetes tipo 2 tienen un mayor riesgo de tener la enfermedad del Alzheimer (Ming Li, Dong, Liu, & Sun, 2017), y el componente no amiloide (NAC) de la α -sinucleína se ha encontrado en las placas de pacientes con dicha enfermedad (Ghosh, Banerjee, & Sil, 2015).

Tabla 1. Enfermedades del sistema nervioso central y periférico causadas por agregados amiloides. Así como las proteínas asociadas a ellas y el tejido afectado.

Enfermedad	Proteína	Tejido afectado
Alzheimer	Péptido β -amiloide Proteína Tau	Cerebro
Parkinson	Proteína α -sinucleína	Cerebro
Hungtintong	Proteína hungtintina	Cerebro
Encefalopatías espongiformes	Priones	Cerebro y sistema nervioso periférico
Amiloidosis	Proteína amiloide A	Hígado, bazo, riñón
Diabetes tipo 2	Polipéptido amiloide de los islotes (IAPP)	Células beta pancreáticas

Como se menciona anteriormente, cada enfermedad de tipo amiloide se asocia con una proteína o péptido particular (Tabla 1). Curiosamente, a pesar de las diferencias en sus secuencias aminoacídicas y en su estructura nativa, todas estas proteínas amiloides comparten una característica en común, su estructura rica en lámina beta, insolubilidad en solventes fuertes y detergentes, resistencia a proteasas y la habilidad de unirse a colorantes específicos de amiloides (Rojo Congo y ThT) (Nelson et al., 2005), además la progresión de la agregación sigue el mismo modelo de nucleación (mencionado anteriormente) de la formación de una especie intermediaria soluble a la generación de protofibras y finalmente la acumulación de agregados fibrilares insolubles (Morales, Moreno-Gonzalez, & Soto, 2013; Moreno-Gonzalez & Soto, 2011). Hasta la fecha se han identificado más de 20 proteínas que forman agregados tipo amiloide de las cuales muchas de ellas causan alguna enfermedad, sin embargo, numerosos estudios *in vitro* han revelado como diferentes proteínas y péptidos que no están relacionados con alguna enfermedad también pueden agregarse en depósitos tipo amiloide bajo condiciones desnaturalizantes específicas. Esta evidencia sugiere que la

agregación proteica puede ser considerada como una propiedad genérica e intrínseca de las cadenas polipeptídicas debido a que todas las proteínas difieren en secuencia y estructura (Chiti & Dobson, 2006; Stefani, 2004).

Se han identificado y estudiado proteínas formadoras de amiloides no relacionadas con enfermedades, entre las que se encuentran la BSA y la albumina sérica humana (HSA), que han sido usadas como un sistema modelo para comprender: a) el mecanismo general de la formación amiloide (Bhattacharya, Jain, & Mukhopadhyay, 2011), b) la aplicación potencial como nanomateriales estructurales (Cherny & Gazit, 2008) y c) la aplicación potencial como agentes liberadores de fármacos (Gupta, Chattopadhyay, Singh, & Surolia, 2010).

2.5. Albúmina Sérica Bovina

La albúmina sérica bovina (BSA) es la forma bovina de las albuminas séricas y ha sido estudiada a detalle por décadas. Esta proteína es sintetizada como un polipéptido de una sola cadena de 607 residuos aminoacídicos, de los cuales los primeros 18 residuos forman el péptido señal y los residuos del 19-24 actúan como pro-péptido que posteriormente mediante modificaciones postraduccionales es cortado, llevando a la formación de una proteína madura de 583 residuos. La BSA posee 35 residuos de cisteína, formando 17 puentes disulfuro (Figura 6). En términos de estructura secundaria es predominante la alfa hélice (74%), además tiene un 11% de lámina beta y un 14% de estructura aleatoria (Majorek et al., 2012; Stathopulos et al., 2008). Es la principal proteína soluble que constituye el sistema circulatorio. La característica más importante de esta proteína es su habilidad para unirse a un gran número de moléculas hidrofóbicas, incluyendo ácidos grasos y varios fármacos (Olson & Christ, 1996; Peters, 1985; Simard et al., 2005). Otra de sus características es que debido a su alto contenido de puentes disulfuro y alfa hélice es muy estable y resistente a la formación de fibras. Sin embargo, bajo ciertas condiciones como sonicación y

alta temperatura, la BSA puede tener una alta propensión a formar agregados tipo amiloides (X.-J. Ma, Zhang, & Zeng, 2018; Stathopulos et al., 2008).

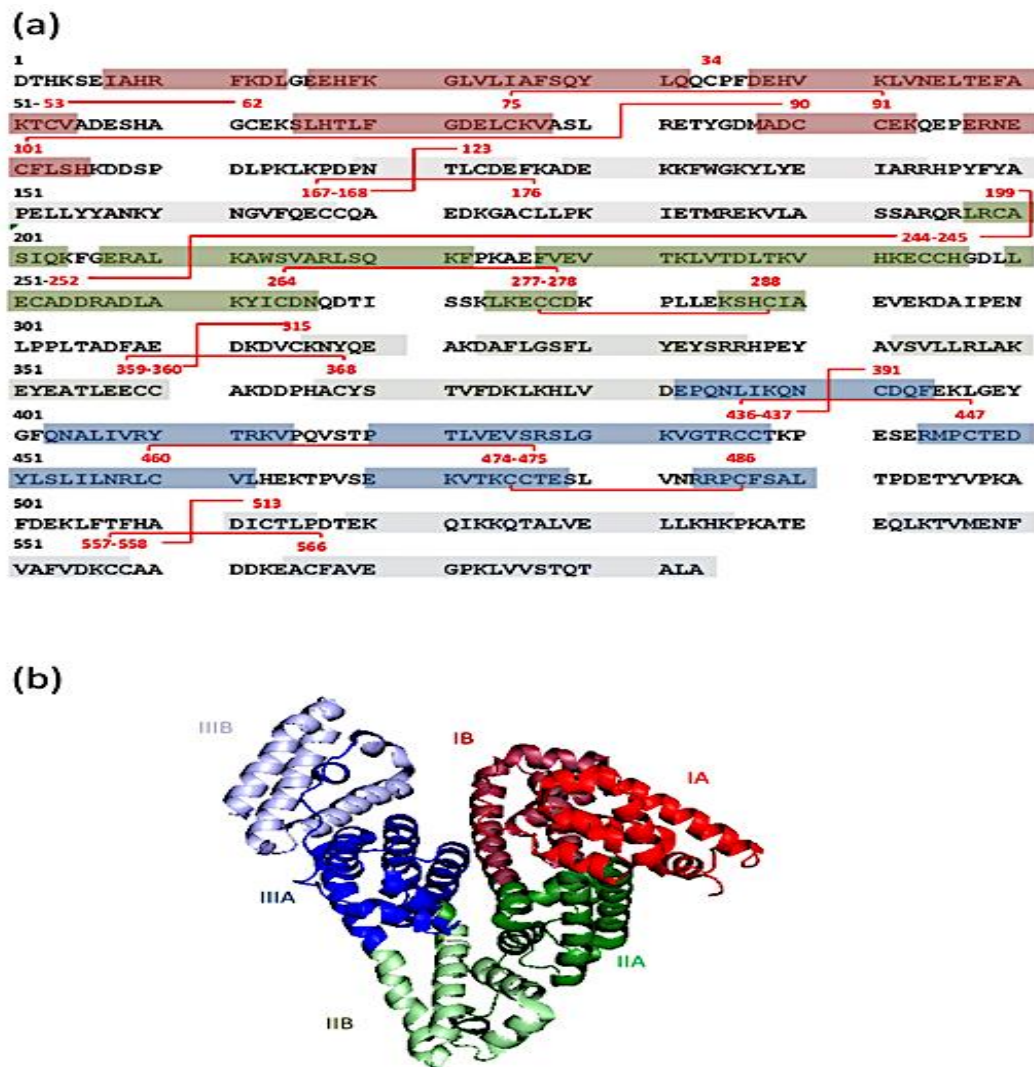


Figura 6. Estructuras a) primaria y b) secundaria de la BSA. En la estructura primaria, se muestra en color rojo los residuos de cisteína y los enlaces localizados en la molécula. Adaptado de Rombouts, Lagrain, Scherf, Koehler, & Delcour, 2015

2.5.1. Formación Amiloide de la BSA por Sonicación

La sonicación de proteínas puede potenciar el desplegamiento y la formación amiloide por desestabilizar las proteínas mediante procesos físicos y químicos (Stathopulos et al., 2008). Esto es debido a que la sonicación produce burbujas

de gas que se colapsan, en un proceso conocido como cavitación, creando muy altas temperaturas locales, fuerzas y radicales libres H^+ y OH^- de la sonólisis del agua. Causando una desestabilización de las proteínas en la interfaz aire-líquido de las burbujas inducidas por sonicación (Satheeshkumar & Jayakumar, 2002). Además, los radicales extremadamente reactivos como el OH^- sufren varias reacciones que resultan en la formación de otras especies reactivas de oxígeno como el H_2O_2 y el O_2 . Posteriormente estas especies reactivas, reaccionan con muchas partes químicas diferentes de las proteínas, produciendo radicales proteicos, que luego experimentan reacciones como la oxidación (Hawkins & Davies, 2001) que probablemente es lo que disminuye la estabilidad de la proteína lo cual es relevante para la formación amiloide.

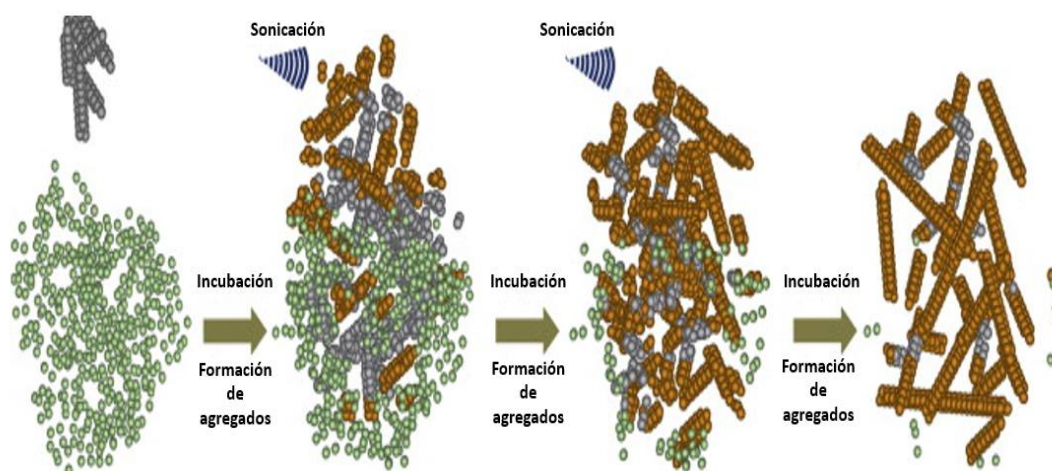


Figura 7. Representación esquemática del proceso de agregación por sonicación. Adaptado de Saá & Cervenakova, 2015.

Mediante esta técnica se combinan ciclos de sonicación e incubación, durante los tiempos de sonicación se crean pequeños núcleos que posteriormente en la etapa de incubación sirven como semillas para la adición de monómeros convirtiéndose así en agregados. Estos ciclos alternados de sonicación-incubación resultan en una amplificación exponencial de agregados amiloides (Saá & Cervenakova, 2015) (Figura 7).

2.5.2. Formación Amiloide de la BSA por Alta Temperatura

Otro método para dar lugar a agregados amiloides de la BSA es por la incubación en altas temperaturas, $\sim 65^{\circ}\text{C}$ (Arakawa & Kita, 2000; Dubey, Anand, Shekhawat, & Kar, 2017; X.-J. Ma et al., 2018) ya que a temperaturas superiores a su temperatura de fusión el desenrollamiento de la proteína es irreversible (Figura 8), llevando a la exposición de segmentos hidrofóbicos inaccesibles de la cadena polipeptídica en el estado nativo, en donde dichos intermediarios no nativos pueden sufrir reordenamientos conformacionales mediados por interacciones intermoleculares como crear nuevos puentes disulfuro entre las cisteínas libres que pueden conducir a la oligomerización y formación de agregados (Bhattacharya et al., 2011; Borzova et al., 2016).

Además, varias investigaciones demuestran mediante análisis de ThT, microscopía electrónica y DC que la BSA tratada bajo estas condiciones (sonicación o temperatura) tiene la habilidad de ensamblarse en estructuras fibrilares ricas en lámina beta (Holm et al., 2007; Stathopoulos et al., 2008; Vetri et al., 2011). Debido a esta característica estructural de la agregación de la BSA, es considerada una razón para seleccionarla como modelo proteico para la agregación amiloide, además de su bajo costo y disponibilidad (Amir, Ali, Mehran, & Akbar, 2016).

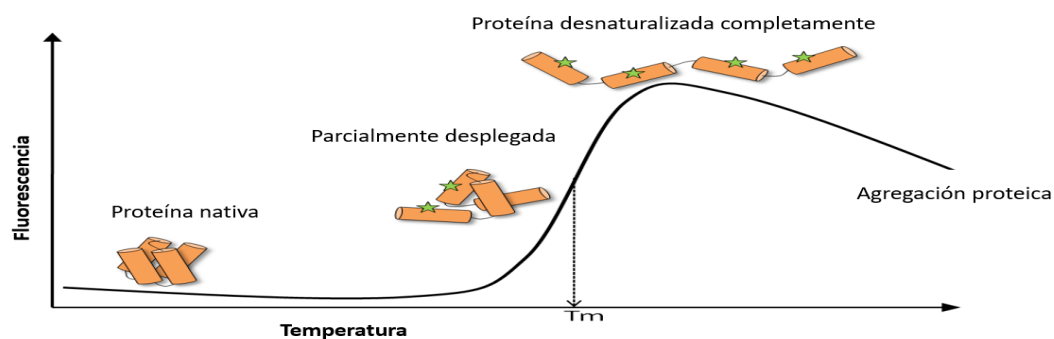


Figura 8. Representación esquemática del proceso de agregación por alta temperatura. Adaptado y modificado de <https://www.interchim.fr/ft/A/AYMD40.pdf>

Debido a la similitud estructural de los agregados amiloides y que estos ocasionan citotoxicidad, existe un enorme interés en encontrar compuestos que inhiban la agregación proteica con el objetivo de desarrollar terapias potenciales para las enfermedades de tipo amiloide (Šneideris, Baranauskienė, et al., 2015).

2.6. Enfoques Terapéuticos Hacia Enfermedades Amiloides

Debido a la importancia de los agregados amiloides en la patología e incurable naturaleza de muchas enfermedades amiloides, se han probado muchas sustancias como inhibidores amiloides con muy buenos resultados. Entre las sustancias probadas se encuentran péptidos, anticuerpos, antibióticos, nanopartículas, moléculas sintéticas pequeñas y compuestos naturales (Figura 9) (Pedersen & Sigurdsson, 2015; Rosenblum, 2014; Valera & Masliah, 2013; Wisniewski & Goñi, 2015). Algunas de las moléculas han tenido serios efectos adversos, incluyendo toxicidad e inducción de inflamación. Otras moléculas son difíciles de sintetizar, tienen una vida media corta o no son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, lo cual es indispensable en enfermedades cerebrales (van Dyck, 2018).

Durante la década pasada, muchas investigaciones se han centrado en moléculas naturales pequeñas, ricas en grupos aromáticos, este enfoque fue basado inicialmente en los hallazgos que demuestran que moléculas aromáticas pequeñas tales como el Congo Red y la ThT pueden interactuar específicamente con fibras amiloides e inhibir su formación (Bravo, 2009; D'Archivio, Filesi, Varì, Scazzocchio, & Masella, 2010; Tsao, 2010).

Varias moléculas pequeñas originarias de la medicina herbal tradicional han demostrado tener un efecto inhibitorio en la agregación de proteínas. Se ha demostrado que los polifenoles naturales pueden ejercer una acción protectora sobre una serie de estados patológicos (Caruana et al., 2011; Cheng et al., 2013).

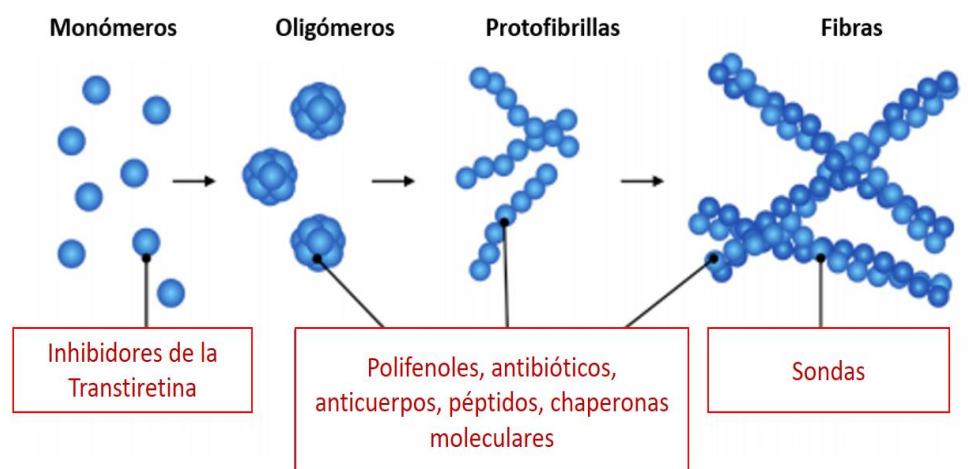


Figura 9. Representación esquemática que muestra los intermediarios de una vía de agregación amiloide genérica (monómeros, oligómeros, protofibrillas y fibrillas). En rojo se muestran las principales clases de moléculas con actividad antiagregante conectadas a las especies a las que se ha informado que se unen preferentemente. Adaptado y modificado de Giorgetti, Greco, Tortora, & Aprile, 2018.

2.7. Compuestos Fenólicos Naturales Como Inhibidores Amiloides

Los polifenoles son una clase de fitoquímicos encontrados en comida o extractos herbales y usualmente exhiben alta disponibilidad, estabilidad y pocos efectos adversos. Estos compuestos pueden ser encontrados en altas concentraciones en frutas, vegetales y otros tipos de comida como vino, té y especias. Se han identificado más de 8000 compuestos polifenólicos desde ácidos fenólicos simples hasta estructuras altamente polimerizadas. Los polifenoles son caracterizados por la presencia de uno o más anillos fenólicos aromáticos en su estructura.

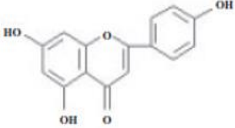

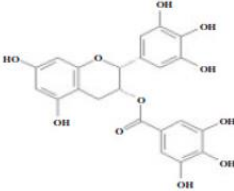
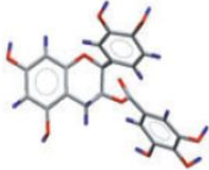
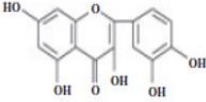
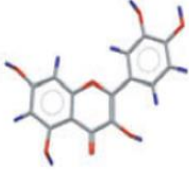
Se categorizan de acuerdo con la estructura química de los aglicones en flavonoides y no flavonoides. El grupo flavonoide es el más grande con más de 5000 compuestos que contienen dos anillos fenólicos en su esqueleto. Se clasifican como flavonoles, flavones, isoflavonas, flavonones, flavonoles y antocianinas (Bravo, 2009; Tsao, 2010). En general, los flavonoides tienen

limitada absorción y baja biodisponibilidad en el cerebro (Crozier, Del Rio, & Clifford, 2010; D'Archivio et al., 2010).

Además de los flavonoides, algunos no flavonoides se les ha atribuido un efecto anti-amiloidogénico y la mayoría de ellos se consideran compuestos antioxidantes potentes.

Entre los flavonoles ampliamente estudiados como inhibidores amiloides se encuentran la apigenina, el EGCG y la quercetina cuyas estructuras se muestran en la Tabla 2:

Tabla 2. Estructura de algunos flavonoles ampliamente estudios como anti-amiloides.

	Polifenol	Estructura 2D	Estructura 3D
A)	Apigenina		
B)	Epigallocatequina-3-galato		
C)	Quercetina		

2.7.1. Apigenina

La apigenina es una flavona con baja toxicidad intrínseca, la cual es encontrada en el perejil, apio, té de manzanilla, cebolla, alcachofa y cáscaras de naranja. Se ha reportado que puede inhibir un amplio espectro de proteínas mal plegadas amiloidogénicas del sistema nervioso central (péptido beta amiloide y la alfa sinucleína) y periférico (insulina), extendiendo la fase lag y reduciendo la formación amiloide. Su función se ha atribuido principalmente a estabilizar proteínas desplegadas vía interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrogeno (Amini, Yazdanparast, & Bahramikia, 2013; Caruana et al., 2011; Florio et al., 2015; Zhao et al., 2011). A pesar de que es un candidato prometedor, no se conoce la existencia de ningún ensayo clínico con apigenina en enfermedades amiloides (Dhouafli et al., 2018).

2.7.2. Epigallocatequina -3- galato

La epigallocatequina -3- galato o EGCG es uno de los principales compuestos activos presentes en el té verde (Cádiz-Gurrea, Fernández-Arroyo, & Segura-Carretero, 2014). Es un flavonol de mucho interés debido a su capacidad antioxidante, antitumoral, antibacteriana y actividad neuroprotectora tanto *in vitro* como *in vivo* (Betts, Sharili, Phee, & Wareham, 2015; Bitu Pinto et al., 2015). Se han reportado favorables efectos en la reducción de la agregación y toxicidad de un gran número de proteínas involucradas en enfermedades amiloides entre las que se encuentran el péptido beta amiloide, insulina, calcitonina y alfa sinucleína, sin embargo, el mecanismo de acción aún se desconoce pero se ha reportado que puede ser a través de la modulación de múltiples vías (Franko et al., 2018; Porat, Mazor, Efrat, & Gazit, 2004). Uno de los mecanismos propuestos es a través de la modulación de la formación de oligómeros tóxicos por unión y estabilización de especies desplegadas de alfa sinucleína y el péptido beta amiloide, reduciendo y redireccionando la vía de agregación hacia agregados amorfos no tóxicos,

bloqueando cambios conformacionales futuros que pueden resultar en agregación y citotoxicidad (Ehrnhoefer et al., 2008).

En humanos, los pacientes con amiloidosis de cadena ligera (trastorno de la médula ósea donde las inmunoglobulinas mal plegadas se depositan en diferentes órganos, incluido el corazón), muestran una mejoría de su condición cardíaca después del consumo regular de té verde en comparación con los pacientes que no lo beben (Mereles, Buss, Hardt, Hunstein, & Katus, 2010). Debido a la acción descubierta para inhibir la agregación de amiloide y el efecto aparente de la administración de EGCG en pacientes posicionan a este flavonoide como uno de los candidatos para ser utilizado en la etapa temprana de las enfermedades o individuos con alto riesgo (Dhouafli et al., 2018).

2.7.3. Quercetina

La quercetina se trata de un flavonol distribuido ampliamente en frutas, vegetales, abundante especialmente en frijoles, alcarrapas y vino tinto.

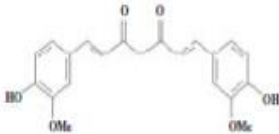
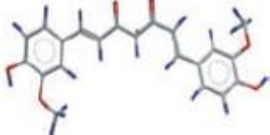
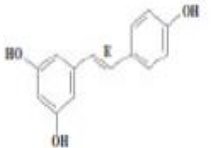
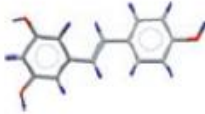
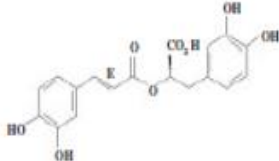

Algunos estudios *in vitro* han demostrado que este polifenol es un inhibidor efectivo contra varias proteínas propensas a agregar como el péptido beta amiloide, la alfa sinucleína y la proteína tau (Jiang et al., 2016; Matsuzaki et al., 2007; Zhu, Han, & Fink, 2013).

El mecanismo de inhibición propuesto implica la interacción directa con proteínas mal plegada, causando la estabilización de especies oligoméricas y la inhibición del crecimiento de fibras. También se ha demostrado que se une covalentemente a la alfa sinucleína, incrementando su hidrofiliidad y por consecuencia inhibe su agregación (Zhu et al., 2013).

En resumen, la quercetina representa un gran candidato para tratar enfermedades neurológicas asociadas con el mal plegamiento de proteínas y agregación, especialmente debido a su habilidad de atravesar la barrera hematoencefálica (Ishisaka et al., 2011).

Entre los polifenoles no flavonoides estudiados como compuestos anti-amiloides están la curcumina, el resveratrol y el ácido rosmárico cuya estructura se muestra en la Tabla 3:

Tabla 3. Estructura de algunos no flavonoles ampliamente estudios como anti-amiloides.

Polifenol		Estructura 2D	Estructura 3D
A)	Curcumina		
B)	Resveratrol		
C)	Ácido rosmarinico		

2.7.4. Curcumina

La curcumina es un compuesto bifenólico encontrado en la *Cúrcuma longa*, muy conocido por sus propiedades antiinflamatorias y antioxidantes (Ghosh et al., 2015; He et al., 2015). Se trata de un inhibidor general de la agregación amiloide debido a su actividad benéfica contra varias enfermedades, incluyendo la enfermedad del Alzheimer, Parkinson, enfermedad priónica y diabetes tipo 2 (Ghosh et al., 2015; Lin, Yu, Jheng, Chung, & Lee, 2013; Spinelli, Osterberg, Meshul, Soumyanath, & Unni, 2015). En el caso de la enfermedad de Alzheimer, mediante estudios *in vitro* e *in vivo* se ha observado que puede unirse e inhibir la agregación del péptido beta amiloide (Yanagisawa et al., 2010; F. Yang et al., 2005). También se ha probado *in vitro* como inhibidor de la agregación de la alfa sinucleína y se ha observado que desestabiliza eficientemente agregados preformados y evita la formación de manera dosis dependiente (Ono & Yamada 2006). En el caso de la amilina, estudios *in vitro* sugieren que la curcumina puede disminuir la formación de agregados y proteger a las células de la toxicidad inducida por amiloides atribuyendo su efecto a la modificación de la conformación proteica (Daval et al., 2010; Sparks, Liu, Robbins, & Lazo, 2012). El potencial anti-amiloide de la curcumina también se ha explorado en enfermedades priónicas, donde se ha demostrado que reduce la acumulación de PrP^{sc} en un modelo celular e inhibir parcialmente la agregación de PrP^c en un ensayo libre de células (Caughey et al., 2003). En resumen, la curcumina es capaz de inhibir la agregación y desagregar fibras preformadas de una amplia variedad de proteínas. Además de eso, también posee un perfil de seguridad bueno y tiene la habilidad de atravesar la barrera hematoencefálica, sin embargo, tiene una biodisponibilidad muy reducida y tal vez esta es la razón por la cual los múltiples ensayos clínicos que estudian la curcumina como tratamiento para enfermedades amiloides no han proporcionado los resultados esperados (Ahsan, Mishra, Jain, Surolia, & Gupta, 2015; Ghosh et al., 2015).

2.7.5. *Resveratrol*

El resveratrol es un compuesto producido por varias plantas cuando existe daño o cuando la planta es atacada por patógenos como bacterias u hongos. Es abundante en uvas, bayas, maní y vino tinto. Se han asociado varias características benéficas con el resveratrol, siendo de interés su capacidad anti-agregante contra diferentes amiloides. Se ha demostrado que inhibe la agregación del péptido beta amiloide transformando selectivamente los oligómeros y convirtiéndolos en especies que no pueden agregarse, reduciendo la citotoxicidad del péptido (Ladiwala et al., 2010). El potencial de este compuesto anti-amiloide también ha sido demostrado en la agregación de la proteína amilina y en agregados de polyQ, reduciendo su toxicidad (Parker et al., 2005; Pithadia, Brender, Fierke, & Ramamoorthy, 2016). Debido a esto, el resveratrol se considera una molécula atractiva que puede ser usada para reducir la agregación proteica implicada en algunas enfermedades, y gracias a su efecto antioxidante ha demostrado efectos prometedores en ensayos clínicos en pacientes con Alzheimer y Parkinson.

2.7.6. *Ácido rosmarinico*

El ácido rosmarinico es compuesto presente en especies usadas comúnmente como hierbas culinarias, tales como la salvia, orégano, albahaca, tomillo y menta. Este análogo de la curcumina inhibe de manera dosis dependiente la formación y extensión de las especies oligoméricas y fibrilares del péptido beta amiloide además desestabiliza agregados preformados *in vitro* (Ono, Hasegawa, Naiki, & Yamada, 2004). Su efecto es a través de interacción directa con las formas oligoméricas, reduciendo la toxicidad asociada al péptido beta amiloide, la hipofosforilación de la proteína tau y así induciendo neuroprotección (Iuvone, De Filippis, Esposito, D'Amico, & Izzo, 2006; Ono et al., 2012). También se ha demostrado que bloquea la formación e induce la desestabilización de fibras de alfa sinucleína. Además, se ha reportado que puede dificultar la formación de fibras e interrumpir los agregados preformados de la lisozima de clara de huevo

de gallina (HEWL), reduciendo su citotoxicidad en el cultivo celular (Ramazzotti et al., 2016; Shariatizi, Meratan, Ghasemi, & Nemat-Gorgani, 2015). También es capaz de unirse a monómeros de insulina, de esta manera bloquea su habilidad para formar fibras amiloides (Zheng & Lazo, 2018). La actividad farmacológica del ácido rosmarinico lo hace un compuesto prometedor para tratar diversas proteinopatías, sin embargo, su efecto anti-amiloide no es de manera dosis dependiente y por esto es menos eficiente que la curcumina.

Como se ha mencionado anteriormente, existe mucha evidencia que indica que compuestos naturales como los polifenoles son inhibidores potentes de la amiloidogénesis, actuando a diferentes niveles. Algunos han demostrado que actúan directamente en el proceso del mal plegamiento y agregación de varias proteínas amiloides. Otros pueden actuar río abajo de la agregación proteica, previniendo la consecuencia toxicas de la acumulación de las proteínas mal plegadas. Sin embargo, también como se mencionó anteriormente, muchos de ellos no pueden ser usados debido a diferentes razones como baja disponibilidad o que no cuentan con la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica. Por lo que, resulta interesante investigar las propiedades antiagregantes que otros polifenoles, entre ellos la Avn-C, pueden tener con el fin de mejorar nuestra comprensión sobre las actividades terapéuticas de estos compuestos en la agregación proteica (Caruana & Vasallo., 2015).

2.8. Avenantramida C

Las avenantramidas son una familia de fitoquímicos encontrados exclusivamente en el grano de la avena, se trata de amidas fenólicas de bajo peso molecular que consisten en un ácido antranílico unido a un ácido hidroxicinámico por medio de un enlace amida (Figura 10).

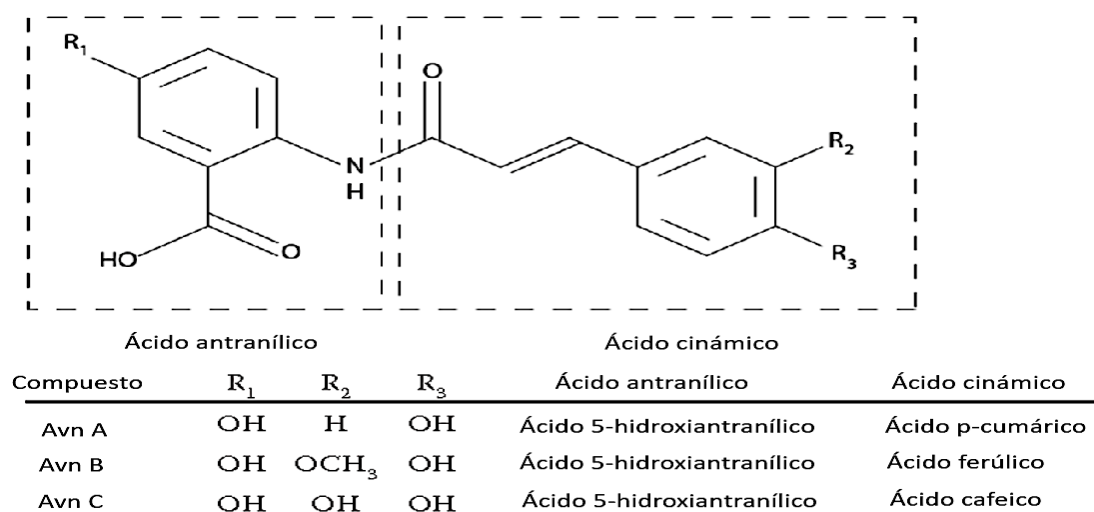


Figura 10. Estructura química de las avenantramidas más abundantes encontradas en el grano de la avena. Adaptado de Boz, 2015.

Se han identificado más de 25 isoformas de avenantramida en los extractos de avena, que varían en los sustituyentes de los anillos de ácido cinámico y ácido antranílico (Peterson, Hahn, & Emmons, 2002). Siendo la avenantramida A, B y C las 3 formas más abundantes con la diferencia de un hidrogeno, hidroxilo o metoxi en el carbono 3 del ácido cinámico (Koenig, Dickman, Wise, & Ji, 2011). Recientemente, se ha reportado que estas tres isoformas principales han demostrado diferentes bioactividades, tales como antioxidantes, anti proliferativas, antihistamínicas, y antiinflamatorias en enfermedades coronarias, cáncer de colon e inflamación de la piel y músculo esquelético (Eichenfield, Fowler, Rigel, & Taylor, 2007; Boz, 2015; Guo, Wise, Collins, & Meydani, 2008; Kang, Shin, Yeo, Lim, & Ji, 2018; Koenig et al., 2016; Meydani, 2009).

Peterson y colaboradores demostraron mediante el uso de la inhibición del beta caroteno y radical libre 2, 2-difenil-1-picrylhydrazyl (DPPH) que aunque todas las avenantramidas exhiben actividades antioxidantes, la Avn-C es la más potente (Peterson et al., 2002). De igual forma, Bratt y colaboradores llegaron a la misma conclusión usando DPPH y métodos de oxidación del ácido linoleico (Bratt et al., 2003). La propiedad antioxidante la Avn-C también se investigó en modelos *in vivo*. En particular, suplementos de Avn-C a una concentración de 0.1g/kg en la dieta de ratas fue efectiva, reduciendo los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el músculo sóleo. Por otra parte, ratas alimentadas con este compuesto tuvieron alta actividad de la superóxido dismutasa en el músculo vasto lateral, hígado y riñones, y una mayor actividad de glutatión peroxidasa en el corazón, en comparación con las ratas control. Además, la suplementación con el mismo, atenuó el aumento de la producción de ROS en el sóleo y la peroxidación de lípidos en el corazón inducida por el ejercicio (Ji, Lay, Chung, Fu, & Peterson, 2003).

Se ha demostrado que esta fuerte capacidad antioxidante de la Avn-C parece ser debida a su grupo ortohidroxil en la molécula de ácido cinámico (Figura 11a) (Fagerlund, Sunnerheim, & Dimberg, 2009; Lee-Manion et al., 2009; J. Yang, Ou, Wise, & Chu, 2014). Además se ha demostrado que el contenido de Avn-C es dos veces mayor que el de la avenantramida A y B en el grano de la avena (Dhakal et al., 2019).

Por otra parte, la estructura de estas es muy similar al fármaco sintético tranilast (Figura 11b), el cual es usado como tratamiento para varias alergias como asma bronquial, dermatitis atópica, conjuntivitis alérgica (Skoglund, 2008; Sur, Nigam, Grote, Liebel, & Southall, 2008).

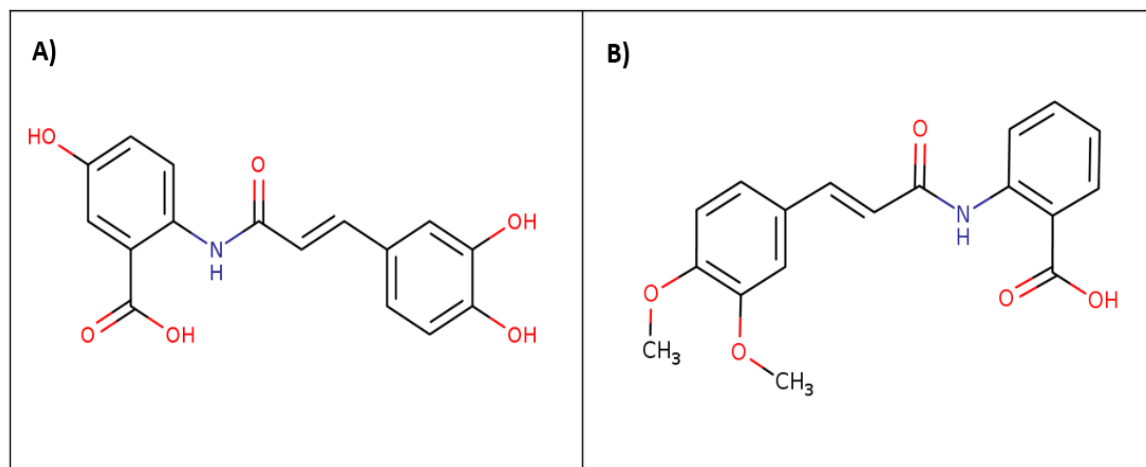


Figura 11. Estructura química de la A) Avn-C y del B) fármaco sintético usado como tratamiento para algunas alergias, tranilast.

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a la potente capacidad antioxidante de la Avn-C y dado que comparte varias características estructurales similares con algunos compuestos que han sido reportados como inhibidores de la agregación de varias proteínas amiloides tanto *in vivo* como *in vitro*, como la curcumina y el EGCG (Franko et al., 2018; Ghosh et al., 2015; Spinelli et al., 2015) surgió nuestro interés en evaluar el comportamiento de la Avn-C frente a los agregados de tipo amiloide.

4. HIPÓTESIS

El empleo de la Avn-C a concentraciones micromolares puede inhibir la agregación tipo amiloide de la BSA.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto inhibitorio de la avenantramida C sobre la agregación amiloide de la albúmina sérica bovina como proteína modelo.

5.2 Objetivos específicos

1. Estandarizar las condiciones experimentales para la formación del agregado tipo amiloide de la BSA.
2. Evaluar el efecto inhibitorio de la Avn-C sobre la agregación tipo amiloide de la BSA.
3. Explorar el mecanismo de inhibición de la agregación de la BSA por la Avn-C.

6. CAPÍTULO I:

Evaluación de dos métodos fisicoquímicos para la formación de fibras amiloides de BSA.

6.1 RESUMEN

Las proteínas son macromoléculas que deben adquirir un plegamiento adecuado para llevar a cabo su función, sin embargo, existen procesos anormales de plegamiento los cuales son inducidos por algún tipo de estrés, resultando en la pérdida de funciones fisiológicas o en la adquisición de conformaciones tóxicas conocidas como agregados amiloides. Hasta la fecha se han identificado más de 20 proteínas que forman agregados de este tipo los cuales, han sido asociados a una gran cantidad de desórdenes neurodegenerativos. Sin embargo, otras proteínas no patogénicas como la BSA pueden adquirir este tipo de conformación mediante condiciones específicas que desestabilizan su estado nativo. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar dos métodos para la formación del agregado tipo amiloide de la BSA con la finalidad de obtener condiciones confiables para la producción de fibras amiloides para investigaciones estructurales futuras. La formación de agregados se llevó a cabo mediante sonicación y alta temperatura y se monitoreo a través del incremento en la intensidad de fluorescencia tras la unión a la ThT, comprobándose además mediante gel de electroforesis nativo. Los resultados demuestran una mayor intensidad de fluorescencia y un patrón electroforético de movilidad más lento cuando se utiliza el método de alta temperatura para la agregación de la BSA, sugiriendo mayor peso molecular y una mejor formación de agregados de tipo amiloide comparado con el obtenido por sonicación.

6.2 INTRODUCCIÓN

Las proteínas son macromoléculas que deben adquirir un plegamiento adecuado para llevar a cabo su función, este plegamiento depende tanto de su secuencia aminoacídica como de la maquinaria presente en la célula, sin embargo existen procesos anormales de plegamiento conocidos como *protein misfolding*, los cuales son inducidos por diversas situaciones de estrés en el ambiente intra o extracelular (Duran-Aniotz et al., 2013; Mahler et al. 2009) y pueden resultar en la pérdida de sus funciones fisiológicas o en la adquisición de conformaciones tóxicas conocidas como agregados amiloides, esta conformación les permite interactuar de manera inadecuada con otros componentes celulares, perjudicando la viabilidad celular (Stefani & Rigacci, 2013). Este tipo de agregados proteicos han sido asociados a una gran cantidad de desórdenes denominados enfermedades de tipo amiloide siendo la enfermedad de Alzheimer, el Parkinson, el Huntington y las encefalopatías espongiformes los ejemplos más conocidos (Rambaran & Serpell, 2008). Hasta la fecha se han identificado más de 20 proteínas que forman agregados de tipo amiloide de las cuales muchas de ellas causan alguna enfermedad, sin embargo, otras proteínas usualmente no patogénicas como BSA también tienen la habilidad de formar este tipo de agregados. A pesar de que la secuencia aminoacídica y la estructura terciaria de este tipo de proteínas no está relacionada con alguna enfermedad, pueden ensamblarse en agregados con una característica en común, su conformación lámina beta. Para lograr su agregación, es necesario emplear condiciones específicas que desestabilicen el estado nativo de la proteína, como son la sonicación (la cual actúa por medio de ondas de ultrasonido) y altas temperaturas (X.-J. Ma et al., 2018; Stathopoulos et al., 2008). Debido a su capacidad para formar agregados con conformación en lámina beta, su bajo costo y su gran disponibilidad, la BSA es una excelente proteína modelo para estudiar el mecanismo de la formación e inhibición de la agregación de las proteínas amiloides (Amir et al., 2016).

Por lo que el objetivo del presente capítulo fue evaluar dos métodos para la formación del agregado tipo amiloide de la BSA con la finalidad de obtener condiciones confiables para la producción de fibras amiloides.

6.3 MATERIALES Y MÉTODOS

6.3.1 Reactivos

La proteína BSA y la sonda ThT se obtuvieron de Sigma Aldrich Inc. El disolvente orgánico, metanol (MetOH) y el buffer Hepes que se empleó en el presente estudio proceden de J.T. Baker. El resto de los reactivos que se emplearon fueron de calidad analítica y proceden de J.T. Baker.

6.3.2 Formación de Agregados Amiloides

Para la formación agregados fibrilares mediante sonicación, la BSA a una concentración de [3mg/ml] en buffer Hepes 20mM pH 7.8 fue sometida a 50 ciclos de sonicación donde cada ciclo consistió en 5 pulsos de 1s de sonicación seguido de 60s de incubación a 37°C, usando un sonicador “Powergen 125” con una amplitud del instrumento del 70 %.

Para la formación agregados fibrilares mediante el método de alta temperatura, la BSA se incubó a una concentración de [3mg/ml] en buffer Hepes 20mM pH 7.8 a 68°C en un “termomixer Eppendorf” por 1 hora.

La formación del agregado proteico se monitoreo por el incremento en la intensidad de fluorescencia tras la unión a ThT.

6.3.3 Ensayo de Fluorescencia de Tioflavina T

La formación del agregado proteico tipo amiloide se monitoreo por el incremento en la intensidad de fluorescencia tras la unión a ThT, para la cual, la muestra se diluyó a una concentración de [15 μ M] en buffer Hepes 20 mM pH 7.8, y se añadió a una solución de la sonda ThT a una concentración de [50 μ M] disuelta en el mismo buffer.

Se monitorearon los cambios en la intensidad de fluorescencia a 480 nm empleando una longitud de onda de excitación de 440 nm en un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS-45. Los espectros se recogieron a 25°C, en una celda de cuarzo de 0.1cm de paso óptico.

Los espectros fueron corregidos restando el blanco correspondiente. Todas las mediciones se llevaron a cabo por triplicado.

6.3.4 Electroforesis en Gel Nativo

La formación de la agregación se comprobó mediante el análisis de movilidad electroforética en un gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes (PAGE-nativa), empleando el gel concentrador al 4% y el separador al 8% durante 2.5h a 80V y 25mA. La electroforesis se realizó con una alícuota de 20 µg de la muestra y se corrió en un sistema Mini-PROTEAN TGX™ (Bio-Rad), por ultimo las bandas se detectaron mediante tinción por azul de Coomassie.

Solución	Gel separador (8%)	Gel concentrador (4%)
Acrilamida	2.60 ml	0.67 ml
Tris 0.375 M pH 8.8	7.24 ml	4.27 ml
PSA 10%	0.10 ml	0.05 ml
TEMED	0.02 ml	0.01 ml

6.3.5 Análisis Estadístico

Los resultados fueron expresados como las medias de los experimentos por triplicados. La significancia estadística de los resultados fue determinada por la prueba t de Student (no apareada) en la cual la hipótesis nula fue rechazada ($P < 0.05$).

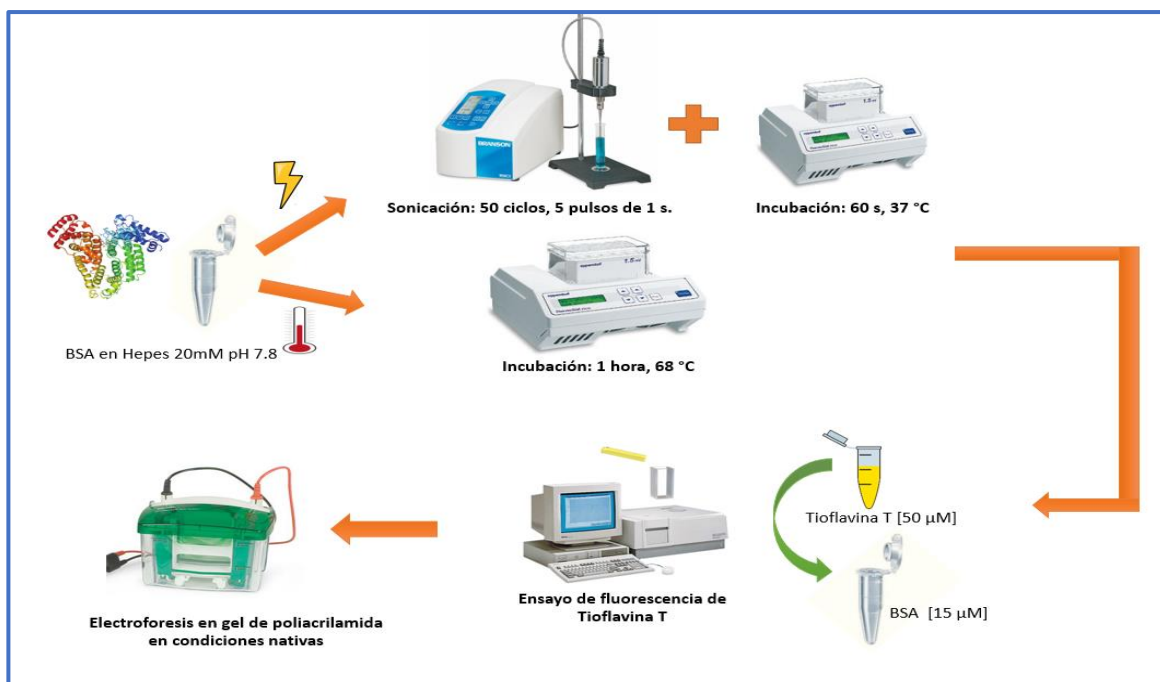


Figura 12. Diagrama de flujo de la metodología empleada de la estandarización de las condiciones experimentales para la formación del agregado amiloide.

6.4 RESULTADOS

Los amiloides son una estructura común de agregación que se ha observado en numerosas proteínas asociadas a enfermedades (Stefani & Dobson, 2003) y se ha propuesto que es una estructura alternativa que todas las proteínas pueden adoptar bajo ciertas condiciones, incluyendo temperatura, pH, fuerza iónica (Borzova et al., 2016) .

Para encontrar las condiciones óptimas de la agregación amiloide se empleó como proteína modelo la BSA, debido a que puede formar este tipo de agregados bajo condiciones específicas, como sonicación y alta temperatura en las cuales su estado nativo es desestabilizado (X.-J. Ma et al., 2018; Stathopulos et al., 2008).

El seguimiento de la formación del agregado de la BSA se analizó por el ensayo de fluorescencia de ThT una sonda sensible a la presencia de láminas β , tales como los agregados de tipo amiloide (Nusrat et al., 2018).

En la Figura 13A se muestra el espectro de emisión de fluorescencia obtenido para la proteína sometida a sonicación, en la cual puede observarse que presenta un máximo de emisión a una longitud de onda $\sim 475\text{nm}$, si se compara con la proteína sin tratamiento, lo que indica la presencia de estructuras secundarias de tipo lámina beta, características de agregados amiloides unidos a la sonda ThT.

Al analizar la agregación realizada por el método de alta temperatura (Fig. 13B), se observa un incremento casi del doble en la intensidad de fluorescencia comparada con la intensidad obtenida por sonicación, lo que sugiere una mayor cantidad de agregados amiloides unidos a la ThT.

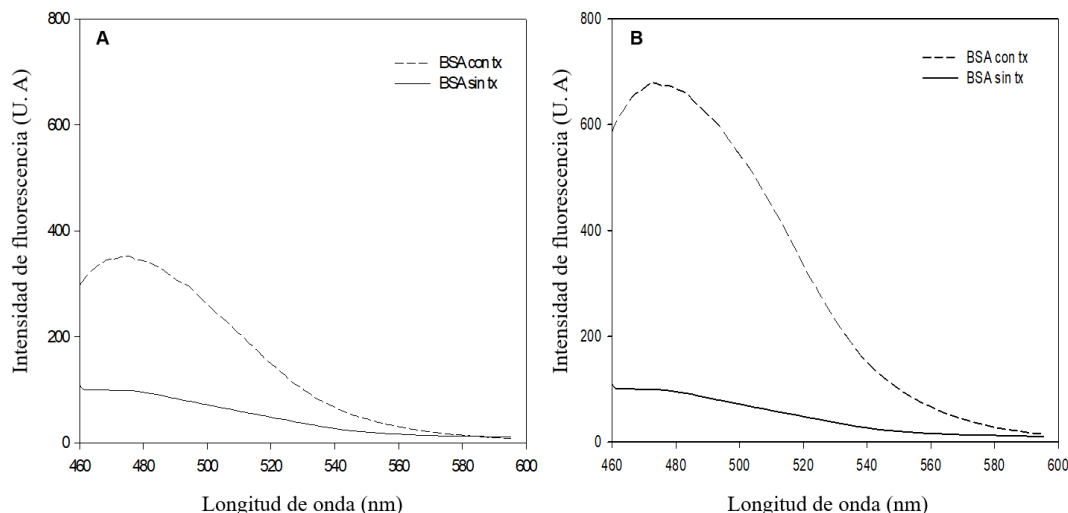


Figura 13. Espectros de emisión de fluorescencia de BSA tratada mediante sonicación y alta temperatura. A) BSA [45 μ M] sometida a 50 ciclos de sonicación (ciclo: 5 pulsos de 1 s) seguido de 60s a 37°. **B)** BSA [45 μ M] incubada a 68 °C por 1 h. Para los espectros se tomó una alícuota proteica (concentración final 15 μ M) a la cual se le añadió la sonda ThT disuelta en buffer Hepes 20 mM pH 7.8 a una concentración final [50 μ M]. La fluorescencia se midió en un espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS45 empleando una λ_{ex} =440nm y una λ_{em} =475nm. Se muestran los espectros promedio de tres experimentos realizados de manera independiente.

Para confirmar la agregación de la proteína se realizó el análisis electroforético en condiciones nativas. En la Figura 14 se muestra la tinción con Coomassie de la proteína antes y después de los tratamientos realizados. Puede observarse que en el carril 1 en ambos geles, aparecen tres bandas donde la de mayor movilidad corresponde a la banda del monómero y las otras dos al dímero y trímero, tal y como ha sido reportado por otros autores (Arakawa & Kita, 2000; C. Li & Arakawa, 2019). En la Figura 14A, carril 2, se observa que la proteína tratada mediante sonicación muestra un patrón electroforético similar a la proteína sin tratamiento, observándose las bandas correspondientes al monómero, dímero y trímero, sin embargo, también se observa otra banda con menor movilidad (señalada con la flecha roja) indicando la presencia de agregados proteicos de mayor peso molecular. El perfil electroforético de la proteína incubada a 68°C por 1 hora (Fig. 14B carril 2) muestra una menor intensidad de la banda correspondiente al monómero y un aumento en la intensidad de la banda

correspondiente al trímero apareciendo además nuevas bandas con menor movilidad (señaladas con la llave) lo que indica una mayor agregación.

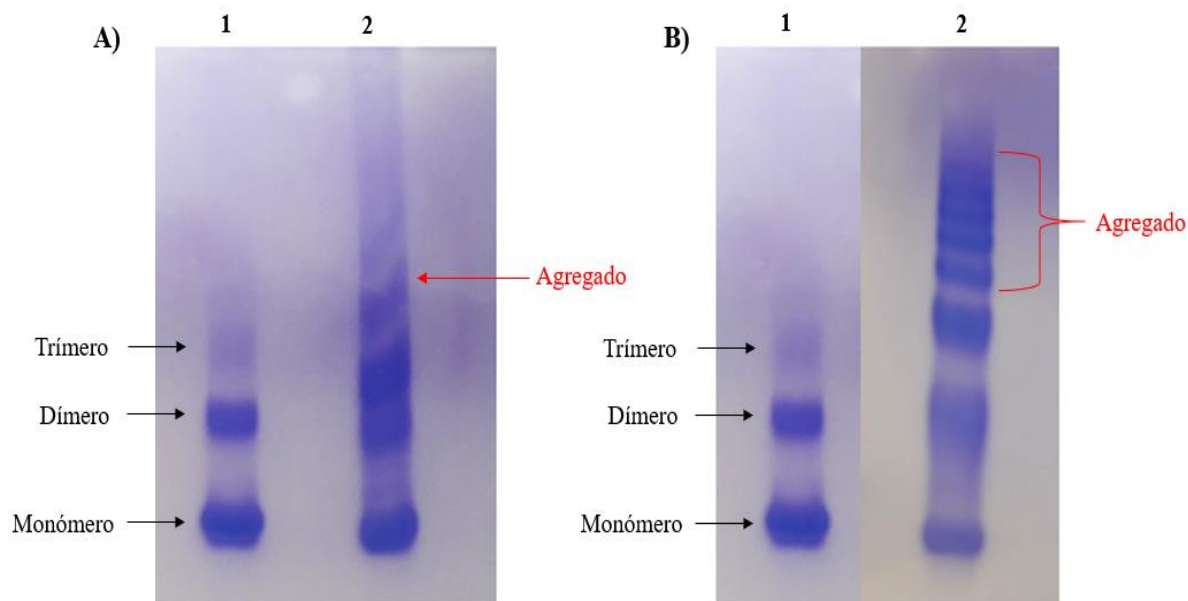


Figura 14. Electroforesis en gel nativo de poliacrilamida al 30% teñido con azul de Coomassie. A) BSA tratada con sonicación, B) BSA tratada por alta temperatura. En ambos geles, el Carril 1 representa la BSA sin tratamiento, el carril 2 representa la BSA con tratamiento. La flecha y la llave indican nuevas bandas formadas después del tratamiento.

Los resultados obtenidos demuestran que el tratamiento por alta temperatura permite una mayor formación de agregados de la proteína modelo BSA comparado con el método de sonicación.

6.5 DISCUSIÓN

Las proteínas en estado nativo pueden desplegarse en presencia de agentes desnaturalizantes o como resultado de su exposición a ciertas condiciones como se mencionó anteriormente, en su estado desplegado pueden tener interacciones intra e intermoleculares gracias a las secuencias hidrofóbicas expuestas llevando a la formación de agregados amiloides (Kopito, 2000).

La BSA generalmente exhibe una estructura estable y resistente a la formación de agregados debido a su alto contenido de puentes disulfuro (17 puentes disulfuro en total) y su estructura en alfa hélice, sin embargo, se ha reportado que temperaturas elevadas, especialmente por encima de la temperatura de fusión (62°C), pueden causar cambios conformacionales en la proteína, llevando a la exposición de segmentos hidrofóbicos inaccesibles de la cadena polipeptídica en el estado nativo, en donde, dichos intermediarios pueden sufrir reordenamientos conformacionales mediados por interacciones intermoleculares no covalentes como puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas o contactos hidrofóbicos que posteriormente conducen a la oligomerización y formación de agregados (Bhattacharya et al., 2011; Borzova et al., 2016). La formación de puentes disulfuro entre cisteínas desapareadas es un ejemplo de modificación química desestabilizante (Senisterra et al., 1997) que puede ser particularmente relevante para la formación amiloide (S. Lee & Eisenberg, 2003). Es por ello que, el tratamiento a 68°C mostró una diferencia significativa ($P < 0.05$) comparado con el tratamiento por sonicación, permitiendo una mayor formación de agregados de tipo amiloide de BSA. Los resultados apuntan a que la sonicación muy probablemente no permite la exposición de los segmentos hidrofóbicos de la proteína de igual manera que lo causa la temperatura elevada, de ahí que se obtengan diferente cantidad de agregados. Es probable que, si el tiempo de sonicación se prolongara, la formación de agregados amiloides se incrementara. Los resultados demuestran también que el tratamiento por alta temperatura es una condición experimental rápida y reproducible para la formación de agregados,

por lo que se seleccionó como el método a emplear para los siguientes ensayos de evaluación de esta tesis.

7. CAPÍTULO II:

Evaluación del efecto inhibitorio de la Avn- C y su mecanismo sobre la agregación tipo amiloide de la BSA.

7.1 RESUMEN

El mal plegamiento de proteínas y su ensamblaje en fibras amiloides con una estructura secundaria rica en lámina beta juegan un rol importante en muchas enfermedades. Los polifenoles han sido ampliamente estudiados como una clase de inhibidores amiloides, cuyo efecto depende de la posición y número de sus grupos hidroxilo alrededor del esqueleto flavonoide. En este estudio se utilizó la BSA como un modelo amiloide para evaluar el efecto anti-amiloide de la Avn-C, una molécula con un linker alifático largo entre dos anillos aromáticos. Se usaron técnicas de espectroscopía tales como ensayo de fluorescencia de la ThT y DC, para seguir los agregados ricos en lámina beta de la BSA sometida a incubación a 68°C. Nuestros resultados indican que la Avn-C muestra un mayor efecto inhibitorio a concentraciones micromolares sobre la oligomerización de la BSA en comparación con el EGCG y la curcumina, lo que demuestra por primera vez, que la Avn-C puede servir como una molécula potencial para prevenir la agregación proteica.

7.2 INTRODUCCIÓN

La agregación proteica es un proceso en que las proteínas se asocian en entidades macroscópicas ordenadas. Dichos agregados generalmente se clasifican como amorfos o altamente ordenados, siendo la forma más común de las fibrillas amiloides posteriores, que muestran varias características fisicoquímicas en común, entre las cuales se encuentra una estructura rica en lámina beta, muy baja solubilidad acuosa y la habilidad de unirse a colorantes específicos como la ThT y Congo red (Morales et al., 2013). La deposición y acumulación de estos agregados es una característica de enfermedades causadas por mal plegamiento proteico (Moreno-Gonzalez & Soto, 2011). En general, cada tipo de agregado proteico se asocia con una enfermedad específica en el sistema nervioso central, siendo la alfa sinucleína la involucrada en la enfermedad del Parkinson (Samii et al., 2004), mientras que agregados del péptido beta amiloide y tau son los principales responsables de la enfermedad de Alzheimer (Duyckaerts et al., 2009). En la enfermedad de Huntington hay presencia de agregados de huntingtina (Ross & Tabrizi, 2011). Entre las enfermedades periféricas se encuentra la diabetes tipo 2 que se caracteriza por la deposición anormal de amilina en las células beta pancreáticas (Mukherjee et al., 2015). La amiloidosis AA se caracteriza por la acumulación de la proteína sérica amiloide A en el hígado, bazo y riñón (Westermarck et al., 2015). Bajo algunas circunstancias, otras proteínas, tales como la albúmina sérica humana, la BSA (Holm et al., 2007; White et al., 2015), la alifosfatasa y la microglobulina β_2 también exhiben fuerte propensión a formar agregados, incluyendo fibras amiloides (Sasahara, Yagi, Sakai, Naiki, & Goto, 2008; Vetri et al., 2011). Aunque se han realizado varios esfuerzos para comprender la patogénesis de estas enfermedades, hasta la fecha no hay un tratamiento para este tipo de desórdenes (Defelice & Ferreira, 2002). Es así, como ha surgido el interés en los compuestos naturales, especialmente en los polifenoles, ya que la mayoría tiene la capacidad antioxidante y son capaces de inhibir la agregación amiloide (Dhouafli et al., 2018). Sus mecanismos de acción son variables, y parece implicar la interacción directa del polifenol con los agregados, sugiriendo que podrían ser muy específicos. El EGCG es uno de

los principales compuestos del té verde, se trata de un flavonol que interviene en la prevención de cambios conformacionales, inhibición de la fibrillogénesis y desagregación de agregados preformados de una gran cantidad de proteínas involucradas en este tipo de enfermedades (Bieschke et al., 2010). Por otra parte, la curcumina es un compuesto bifénolico no flavonoide que se encuentra en la *Cúrcuma longa*, se ha reportado ser un inhibidor general de la agregación amiloide debido a su actividad beneficiosa contra diversos desordenes, como la enfermedad del Alzheimer, Parkinson y diabetes tipo 2 (Ghosh et al., 2015). Desafortunadamente, su biodisponibilidad es baja, debido a una absorción intestinal baja y un metabolismo rápido en el hígado, seguido de la eliminación a través de la vesícula biliar y la excreción fecal (Schiborr, Eckert, Rimbach, & Frank, 2010; Wahlstrom & Blennow, 1978). Por lo que el objetivo del presente capítulo fue evaluar la actividad anti-amiloide de la Avn-C, un compuesto polifenólico de bajo peso molecular que se encuentra en la *avena sativa*. Se trata de un polifenol con alta actividad antioxidante entre todas las avenantramidas, además posee otras propiedades, antiinflamatorias, antipruríticas, antiaterogénicas y vasodilatadoras (Dimberg, Sunnerheim, Sundberg, & Walsh, 2001; Lee-Manion et al., 2009). A pesar de las similitudes estructurales con la curcumina, no hay evidencia del efecto anti-amiloide de la Avn-C sobre la agregación proteica. En el presente estudio se utilizó la BSA como proteína modelo para elucidar el potencial anti-amiloide de la Avn-C. Nuestros resultados indicaron que la Avn-C puede inhibir la agregación amiloide de la BSA, teniendo un mejor efecto inhibidor que el EGCG y la curcumina.

7.3 MATERIALES Y METODOS

7.3.1 Reactivos

La proteína BSA, la Avn-C, la sonda ThT, el 1-Anilino-8-naftaleno sulfonato (ANS) se obtuvieron de Sigma Aldrich Inc. El disolvente orgánico, metanol (MetOH) y el buffer Hepes que se empleó en el presente estudio proceden de J.T. Baker. El resto de los reactivos que se emplearon fueron de calidad analítica y proceden de J.T. Baker.

7.3.2 Inhibición de la agregación amiloide

Para la inhibición de la agregación amiloide mediante compuestos polifenólicos, la BSA fue incubada a una concentración de [3mg/ml] en buffer Hepes 20mM pH 7.8 en ausencia y presencia de distintas concentraciones [100 μ M, 250 μ M y 500 μ M] de curcumina, EGCG y Avn-C (disueltos en metanol) a 68°C en un “termomixer Eppendorf” por 96 horas. Se tomaron alícuotas de las muestras pre-incubadas a diferentes tiempos con y sin el compuesto para su posterior análisis por el incremento en la intensidad de fluorescencia tras la unión a ThT. Además, se caracterizó por DC y electroforesis en condiciones nativas.

7.3.3 Ensayo de Fluorescencia de Tioflavina T

La inhibición del agregado proteico mediante los compuestos polifenólicos se monitoreo por el incremento en la intensidad de fluorescencia tras la unión a ThT, para la cual, cada muestra pre-incubada en ausencia y presencia de las distintas concentraciones de los compuestos se diluyó a una concentración final de [5 μ M] en 442 μ L de una solución de ThT preparada a [20 μ M] en buffer Hepes 20 mM pH 7.8.

Se monitorearon los cambios en la intensidad de fluorescencia a 480 nm empleando una longitud de onda de excitación de 440 nm en un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS-45. Los espectros se recogieron a 25°C, en una celda de cuarzo de 0.1cm de paso óptico.

Para corregir el ruido de la muestra se hicieron mediciones iniciales de las soluciones de ThT incubada sola o en presencia de varias cantidades de polifenol a la misma concentración usada en el ensayo de inhibición. Todas las mediciones se llevaron a cabo por duplicado.

7.3.4 Electroforesis en Gel Nativo

La inhibición de la agregación amiloide se comprobó mediante el análisis de movilidad electroforética en un gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes (PAGE-nativa), empleando el gel concentrador al 4% y el separador al 8% durante 4 horas a 80V y 25mA.

La electroforesis se realizó con una alícuota de 20 µg de la muestra a las 96 horas de incubación en ausencia y presencia de 100, 250 y 500 µM de Avn-C y se corrió en un sistema Mini-PROTEAN TGX™ (Bio-Rad), por ultimo las bandas se detectaron mediante tinción por azul de Coomassie.

Se realizó de acuerdo a la preparación mencionada en el capítulo anterior.

7.3.5 Ensayo de fluorescencia de 1-anilino-8 naftaleno sulfonato (ANS)

El agregado amiloide a una concentración de 0.5 µM en ausencia y presencia de las distintas concentraciones (100, 250 y 500 µM) de Avn-C fue mezclado con un exceso molar de 200 veces más de ANS disuelto en buffer Hepes 20 mM pH 7.8 y se incubaron en oscuridad por 30 minutos a temperatura ambiente.

Se monitorearon los cambios en la intensidad de fluorescencia empleando una longitud de onda de excitación de 380 nm y emisión entre 400 y 600 nm en un

espectrofluorímetro Perkin Elmer LS-45. Los espectros se recogieron a 25°C, en una celda de cuarzo de 0.1cm de paso óptico.

Los espectros fueron corregidos restando el blanco correspondiente. Todas las mediciones se llevaron a cabo por triplicado.

7.3.6 Apagamiento de la fluorescencia del triptófano

Los experimentos del apagamiento de la fluorescencia del triptófano fueron llevados a cabo a 25°C en una celda de cuarzo de 1.5 ml usando un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS-45. Se monitorearon los cambios en la intensidad de fluorescencia a 340 nm empleando una longitud de onda de excitación de 280 nm.

Se preparó una solución de BSA a una concentración de 0.6 µM en buffer PBS 20mM pH 7.4 y varias cantidades de Avn-C fueron añadidas a la solución proteica de un stock concentrado del polifenol (1 mg/ml en metanol). Las concentraciones finales de Avn-C fueron 0, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2, 1.8 y 3 µM. Las soluciones fueron mezcladas antes de obtener los espectros de emisión. Entre cada medición, la celda se lavó tres veces con agua.

Se realizó un blanco para cada concentración de polifenol y el espectro del blanco se restó automáticamente del espectro de emisión de la solución correspondiente.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se calcularon los valores medios.

7.3.7 Principios del apagamiento de la fluorescencia

El apagamiento de la fluorescencia es descrito por la ecuación de Stern-Volmer (Ecuación 1):

$$F_0/F = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q]$$

Donde F_0 y F son las intensidades de fluorescencia antes y después de la adición del apagador (Avn-C) respectivamente, $[Q]$ es la concentración del apagador y K_{SV} es la constante de apagamiento Stern-Volmer. Siendo k_q la constante de apagamiento bimolecular, τ_0 es el tiempo de vida promedio del fluoróforo (en este caso de los residuos triptófano y tirosina dentro de la albúmina) en ausencia del apagador.

Por lo tanto, esta ecuación fue aplicada para determinar los valores de K_{SV} por regresión lineal representando en una gráfica F_0/F contra $[Q]$. Asumiendo que el tiempo de vida de la fluorescencia del biopolímero BSA fue de 10^{-8} , la constante de apagamiento (k_q) puede ser calculada usando la ecuación 2:

$$K_{SV} = k_q \times \tau_0$$

En caso de que el apagamiento sea estático, el valor de la constante de unión (K_a) y el número de sitios de unión (n) se pueden determinar a partir de la ecuación logarítmica doble (ecuación 3):

$$\log (F_0 - F)/F = \log K_a + n \times \log [Q]$$

La pendiente de la gráfica logarítmica doble produce el número de los sitios de unión y la intersección proporcionan la constante de unión (K_a).

7.3.8 Espectroscopía por Dicroísmo Circular

Los cambios en la estructura secundaria de la BSA incubada en ausencia y presencia de los diferentes polifenoles fue determinada por DC. Para lo cual, las muestras que fueron analizadas por fluorescencia de la ThT se colocaron en una celda de cuarzo de 0.1mm de longitud y escaneadas en una unidad de temperatura controlada (Jasco) a 25°C. El espectro de DC del buffer solo también fue analizado. El espectro de DC fue obtenido de las muestras proteicas en ausencia

y presencia de polifenol a las 96 horas de reacción. Para obtener el espectro de la proteína monomérica, la muestra fue incubada a 37°C por 24 horas antes del análisis.

Los espectros fueron recuperados tomando un promedio de tres escaneos a 100 nm/min sobre el rango espectral de 190-240 nm usando un espectrómetro JASCO (modelo J-1100).

El análisis matemático se llevó a cabo usando el algoritmo Contin LL empleando Dichroweb, permitiendo la comparación de los porcentajes de la estructura secundaria de la BSA.

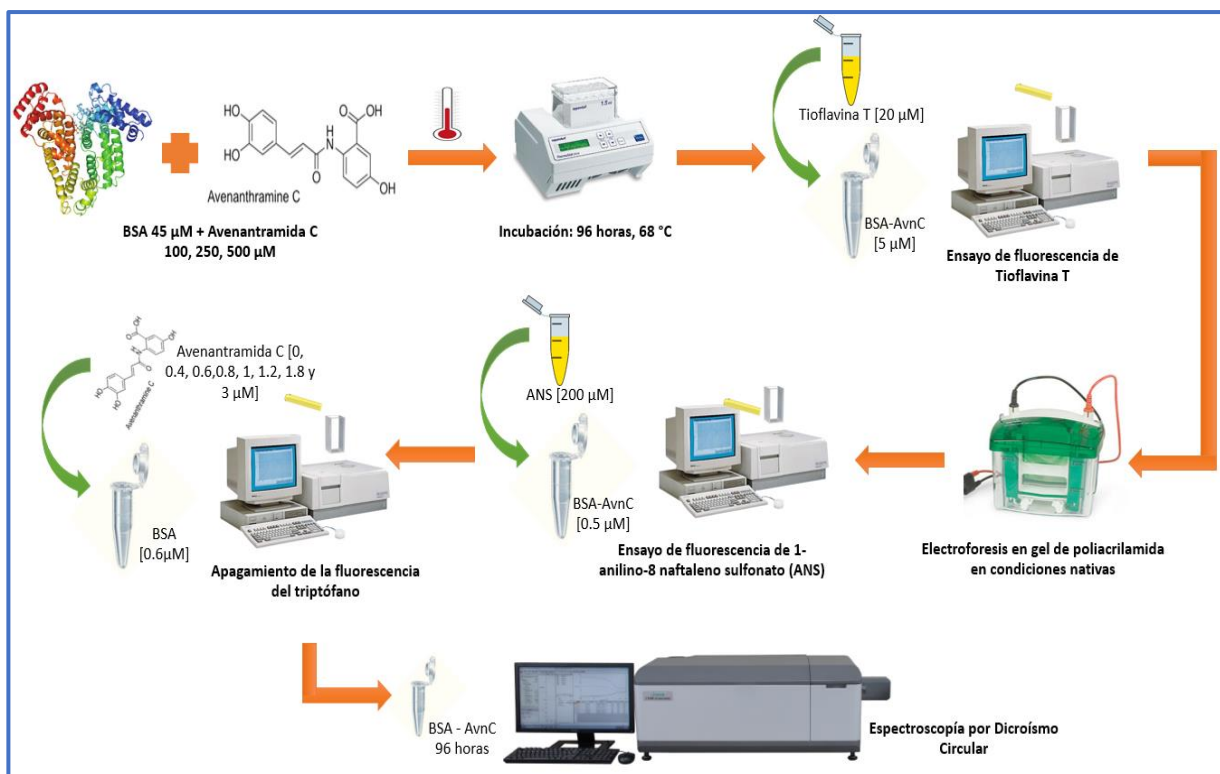


Figura 15. Diagrama de flujo de la metodología empleada para la inhibición de la agregación de la BSA mediante Avn-C.

7.4 RESULTADOS

Debido a la importancia de los agregados proteicos en la patología y la naturaleza incurable de muchas enfermedades asociadas a amiloides existe un enorme interés en encontrar compuestos que inhiban dicha agregación con el objetivo de desarrollar terapias potenciales para las enfermedades relacionadas al mal plegamiento proteico (Dhouafli et al., 2018). Se han explorado muchos compuestos polifenolicos que han demostrado tener un efecto inhibitorio en la agregación proteica, entre los que se encuentran la curcumina, el EGCG, el resveratrol, entre otros (Franko et al., 2018; Ladiwala et al., 2010; Spinelli, 2015). Por lo que el objetivo de este capítulo fue evaluación del efecto inhibitorio de la Avn- C y su mecanismo sobre la agregación tipo amiloide de la BSA

La formación amiloide de la BSA se llevó a cabo por la incubación de la proteína monomérica en PBS 20mM pH 7.4 a temperatura elevada cerca de su temperatura de fusión (T_m) y la cinética de agregación fue monitoreada por el ensayo de fluorescencia de ThT de las muestras a diferentes tiempos. Como se mencionó en el apartado anterior, la ThT es una sonda específica de proteínas amiloides, usada para detectar la presencia de agregados fibrilares que presentan estructuras de tipo lámina beta tanto *in vivo* como *in vitro*. El incremento en la intensidad de fluorescencia con un pico de emisión a 480 nm es característico de la presencia de fibras amiloides (LeVine, 1999). Las intensidades de fluorescencia de ThT no se ven afectadas por la presencia de proteínas globulares en estado nativo, proteínas en estado desplegado o por agregados proteicos amorfos (Khurana et al., 2005).

En la figura 16A se muestra la evolución típica del espectro de fluorescencia de la ThT en función del tiempo, indicando la formación de agregados tipo amiloides. La cinética de agregación (Figura 16B) demuestra que la intensidad de fluorescencia de la ThT incrementó bruscamente dentro de las primeras horas

del tratamiento con calor, alcanzando una región casi meseta a las 18 horas, que pareció completarse a las 24 horas, cuando todos los monómeros se incorporaron a las fibras y permanecen estables hasta las 48 horas de incubación, lo que indica la formación de agregados tipo amiloides ricos en lámina beta, y por lo tanto, un aumento en los sitios de unión a la ThT.

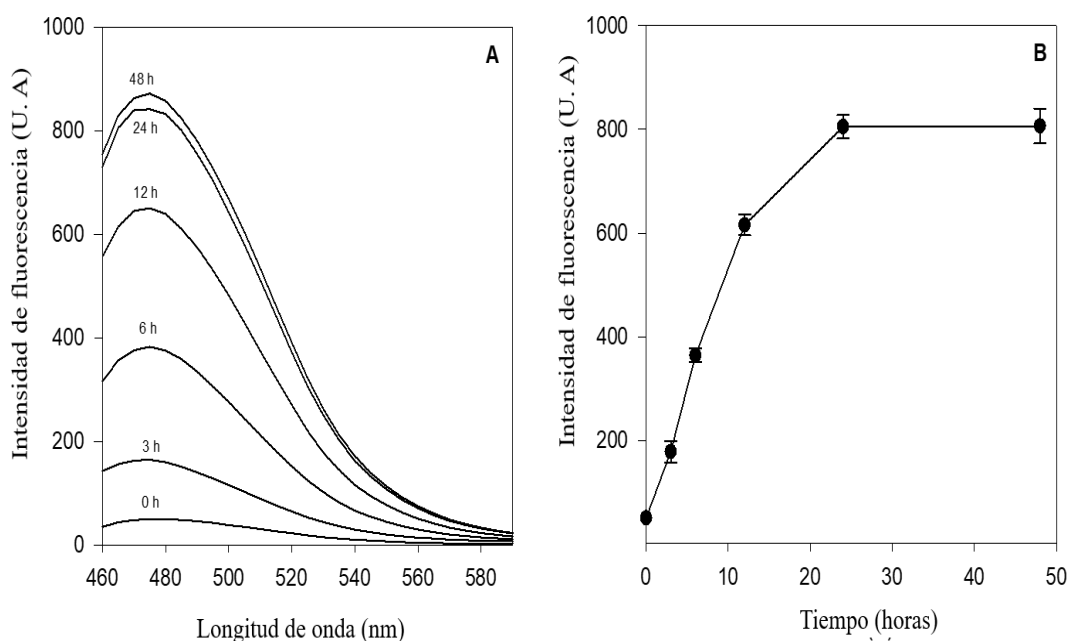


Figura 16. Perfil de agregación de la BSA monitoreada usando el ensayo de fluorescencia de la ThT. La agregación amiloide de la proteína se realizó en Hepes 20mM pH 7.8 a 68°C monitoreándose los cambios en la intensidad de fluorescencia a 480 nm después de la excitación a 440 nm. Para los espectros se tomó una alícuota proteica (5 μ M concentración final) a la cual se le añadió la sonda ThT a una concentración final [20 μ M]. **A)** Evolución de los espectros de emisión en función del tiempo. **B)** Cinética de fluorescencia de la ThT. Los datos en el punto 0 representan la intensidad de fluorescencia a temperatura ambiente antes de calentar. Los datos son representados como las medias de tres experimentos realizados de manera independiente.

Para evaluar el efecto de la Avn-C (Figura 17A) en la fibrilación amiloide de la BSA, la proteína fue incubada a alta temperatura y tratada con distintas concentraciones del polifenol para posteriormente evaluar el grado de agregación

mediante el ensayo de fluorescencia de ThT. La adición de Avn-C sustancialmente suprimió la formación de fibras amiloides, como es evidente por el decremento en la intensidad de fluorescencia de manera dependiente de la concentración del polifenol (Figura 17B). En la figura se puede observar que la intensidad de fluorescencia de la BSA co-incubada con las diferentes concentraciones de Avn-C se reduce en un ~70% en presencia de 500, 250 μ M y únicamente en un 58% en presencia de 100 μ M de Avn-C, comparado con la BSA en ausencia del polifenol. Estos resultados sugieren que en las muestras incubadas con el polifenol se redujo la formación de estructuras en lámina beta.

Además de este decremento en la intensidad de fluorescencia, se observa un desplazamiento hacia el rojo, a ~495nm de la ThT cuando la muestra fue incubada con la más alta concentración de Avn-C. Este desplazamiento del espectro puede ser debido a la unión de la sonda con diferentes estructuras subyacentes de las fibras amiloides, que dan diferentes rendimientos cuánticos, como han observado otros autores (Juárez, Taboada, & Mosquera, 2009).

Los estudios cinéticos usando el ensayo de la fluorescencia de la ThT nos permitieron determinar la fase de la fibrilización que fue más afectada por la interacción con Avn-C. En la curva de agregación de la formación de fibras amiloides se pueden distinguir tres fases: una fase lag, una fase de crecimiento y una fase estacionaria. En presencia de diferentes concentraciones de Avn-C (100, 250 y 500 μ M), se conservó la forma sigmoideal de la curva con respecto al tiempo (Figura 17C). Se puede observar que todas las concentraciones de Avn-C probadas en este estudio, tienen un impacto en la intensidad de fluorescencia máxima de la fase de equilibrio, reduciéndose aproximadamente un cuarto de la intensidad de fluorescencia observada durante la fibrilización de la BSA en ausencia del polifenol.

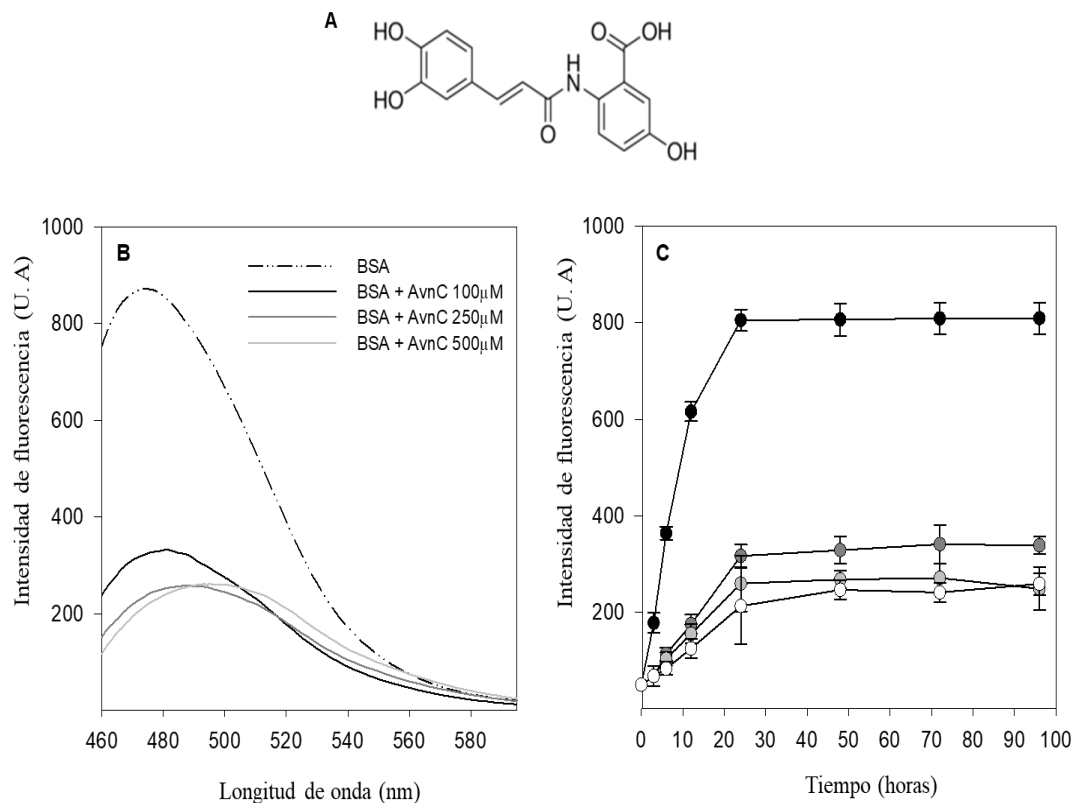


Figura 17. Inhibición de la formación de amiloide BSA en presencia de Avenantramida-C monitorizada usando fluorescencia ThT. **A)** Estructura de Avn-C utilizada en este estudio. **B)** Espectros de fluorescencia de BSA (45 μM) incubados a 68 ° C durante 96 horas en ausencia (línea punteada) y presencia de Avn-C a 100 μM (línea negra), 250 μM (línea gris oscuro) y 500 μM (línea gris). **C)** Cinética de fluorescencia de la BSA en ausencia (círculo negro) y presencia de Avn-C a 100 μM (círculo gris oscuro), 250 μM (círculo gris) y 500 μM (círculo blanco). Los datos son representados como las medias de tres experimentos realizados de manera independiente.

Cuando se comparó el grado de inhibición de la Avn-C con otros polifenoles, este resultó ser más efectivo. La adición de EGCG o curcumina llevó a una desaceleración de la cinética de agregación de la BSA (Figura 18A y 18B). La efectividad de los polifenoles usados en este trabajo fue Avn-C > EGCG > Curcumina, según lo definido por la intensidad de fluorescencia más baja de ThT. Con la concentración más alta (500 μM) probada de polifenol la intensidad de

fluorescencia de ThT se redujo en un 70%, 65% y 57% con Avn-C, EGCG y curcumina, respectivamente.

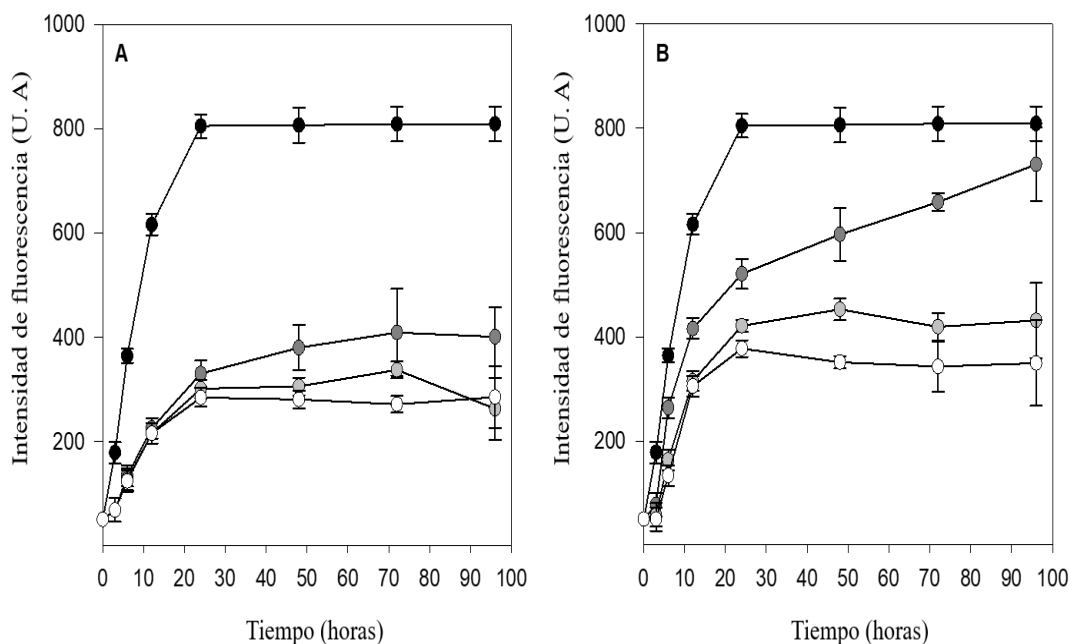


Figura 18. Inhibición de la formación amiloide de la BSA en presencia de curcumina y EGCG monitoreada usando el ensayo de fluorescencia de la ThT. **A)** Cinética de fluorescencia de BSA en ausencia (círculo negro) y presencia de EGCG a 100 µM (círculo gris oscuro), 250 µM (círculo gris) y 500 µM (círculo blanco). **B)** Cinética de fluorescencia ThT de BSA en ausencia (círculo negro) y presencia de curcumina a 100 µM (círculo gris oscuro), 250 µM (círculo gris) y 500 µM (círculo blanco). Los datos son representados como las medias de tres experimentos realizados de manera independiente.

Dado que la Avn-C es una molécula ópticamente activa debido a sus anillos aromáticos, se evaluaron posibles artefactos ópticos en las condiciones de trabajo utilizadas para el ensayo de ThT y se obtuvieron los espectros de absorbancia en el rango de 400-700 nm, así como los espectros de fluorescencia en el rango de 460-590 nm tras la excitación a 440 nm. Se observó que la Avn-C no absorbió a la longitud de onda probada en comparación con la BSA (figura 19A). Cuando

se incubó la Avn-C con ThT en ausencia de BSA, no hubo ningún cambio significativo en la intensidad de fluorescencia después de excitar a 440 nm, indicando que la Avn-C no forma fibras amiloides por sí sola, ni es probable que interactúe con la ThT libre (figura 19B). Tomando en cuenta estos resultados, se tiene evidencia que los artefactos ópticos no son relevantes en las condiciones de medición utilizadas.

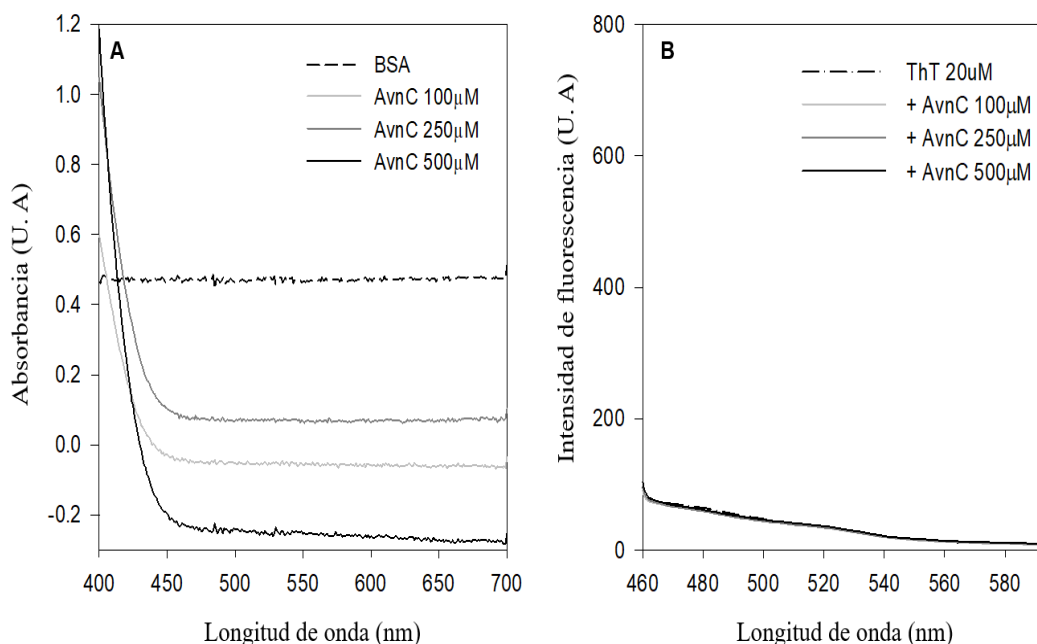


Figura 19. La Avn-C no perturba las señales de fluorescencia de la ThT. **A)** Espectros de absorbancia de BSA y Avn-C a diferentes concentraciones, indican que no se produce dispersión debido a la solubilidad limitada de los compuestos. **B)** Los espectros de fluorescencia de los mismos compuestos excitados a 440 nm, indican que no se produce emisión a 480 nm, donde la ThT muestra el pico asociado a amiloides. Todas las muestras fueron incubadas 2 horas antes de tomar medidas.

El efecto inhibitorio de la Avn-C sobre la fibrilización de la BSA fue respaldado por el análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas. Como se observa en la figura 20, la proteína incubada a alta temperatura en ausencia del polifenol mostró ensamblajes de alto peso molecular

(correspondientes a fibras amiloides) y bandas de bajo peso molecular que corresponden a la proteína monomérica (carril 2).

La BSA incubada en presencia de 100 μM de Avn-C presenta un patrón similar al agregado de BSA, indicando que el polifenol no evitó la agregación proteica a esa concentración (carril 3). Sin embargo, los ensambles de alto peso molecular se redujeron en las muestras que contenían 250 y 500 μM de Avn-C (carril 4 y 5), indicando el efecto inhibitorio de la fibrilización de BSA.

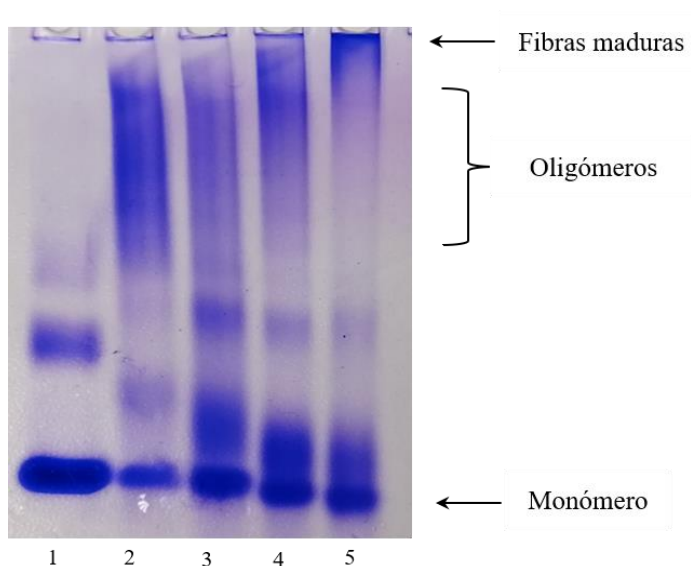


Figura 20. Electroforesis en gel nativo de poliacrilamida de BSA antes y después de la agregación por calor en ausencia y en presencia de Avn-C: Carril (1) BSA soluble; Carril (2) agregados de BSA; Carril (3) BSA en presencia de 100 μM Avn-C; Carril (4) BSA en presencia de 250 μM Avn-C y Carril (5) BSA en presencia de 500 μM de Avn-C.

Para investigar si los cambios estructurales de la BSA provocados por las condiciones amiloidogénicas pudieron protegerse por la Avn-C, se llevaron a cabo estudios de espectroscopía por DC en el UV lejano (190-240 nm). La conversión de alfa hélice a lámina beta es una característica típica de la formación amiloide. En la figura 21A se muestra el espectro de la proteína monomérica

(antes de la incubación a alta temperatura), la curva de DC exhibe dos picos de elipticidad negativa alrededor de ~ 208 y 222 nm y un pico de elipticidad positiva a 195 nm, lo que es característico de una estructura alfa hélice. El espectro después del tratamiento térmico demuestra únicamente un solo pico de elipticidad negativa, indicando la adquisición de una estructura lámina beta.

Las muestras de BSA co-incubadas con $100 \mu\text{M}$ de Avn-C después de 96 horas también presentaron mínimos de absorción alrededor de 218 nm, pero este valor fue más bajo comparado con la muestra de BSA agregada en ausencia de éste. Con altas concentraciones del polifenol, los mínimos de elipticidad a 222 y 208 nm incrementaron progresivamente indicando una reducción de la estructura en lámina beta y un incremento de alfa hélice (Figura 21B).

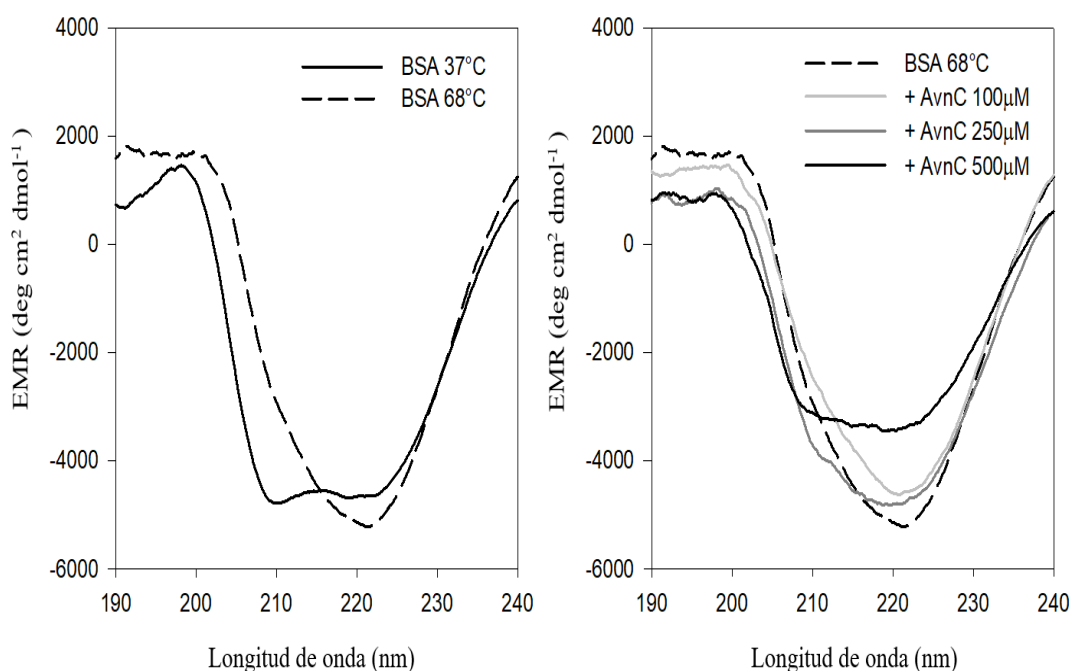


Figura 21. Cambios en la estructura secundaria de la BSA monitoreados por DC en el UV lejano. **A)** Espectro de DC de la BSA incubada a 37°C por 2 horas (línea sólida) y agregado de BSA inducido por calor a 68°C por 48 horas (línea discontinua). **B)** Espectro de DC del agregado de BSA inducido por calor en ausencia (línea discontinua) y presencia de $100 \mu\text{M}$ (línea gris), $250 \mu\text{M}$ (línea gris oscuro) y $500 \mu\text{M}$ (línea negra) de Avn-C.

El análisis de la estructura secundaria basado en el espectro de DC se calculó usando el algoritmo Contin LL de DichroWeb (Whitmore & Wallace, 2004). El espectro sugiere que la BSA monomérica tiene un alto contenido de alfa hélice (61%) con 6% de lámina beta, 18% de giro beta y un 15% de estructura aleatoria que es consistente con la literatura reportada (34). Después de la incubación a 68°C, se presentó una reducción importante de 61% a 18% de alfa hélice, además un incremento significativo de la estructura lámina beta de un 6% a un 43%. Las muestras de BSA co-incubadas con Avn-C exhiben una reducción en el porcentaje de lámina beta, mientras que el porcentaje de alfa hélice aumenta de manera dependiente de la concentración (tabla 4), indicando la inhibición de la transformación estructural por Avn-C que es consistente con las mediciones de fluorescencia ThT.

Tabla 4. Porcentajes de estructura secundaria de la BSA en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de aventramida C calculados por el método CONTIN-LL (DichroWeb).

Muestra	Alfa-hélice (%)	Lámina beta (%)	Giro (%)	Aleatoria (%)
BSA monómero	61	6	18	15
BSA agregada	18	43	20	19
BSA agregada + 100mM AvnC	10	42	19	29
BSA agregada + 250mM AvnC	22	32	18	28
BSA agregada + 500mM AvnC	26	30	18	26

Se ha establecido muy bien que el ambiente hidrofóbico y los aminoácidos hidrofóbicos en las proteínas juegan un rol clave en la formación amiloide y los estudios de ThT y CD realizados, confirman que la Avn-C retrasa este proceso. Esto se puede deber a la reducción de hidrofobicidad en la superficie proteica.

Para probar esta hipótesis e investigar el posible mecanismo de inhibición que ejerce la Avn-C, se empleó el análisis por ANS, que es una sonda que demuestra fluorescencia insignificante en soluciones acuosas, sin embargo, bajo la unión a aminoácidos hidrofóbicos la intensidad de fluorescencia incrementa junto con un desplazamiento hacia el azul. En la figura 22A se muestra el espectro de unión del ANS con la BSA en ausencia y presencia de avenantramida C. Se puede observar que el agregado de BSA causa un incremento en la intensidad de fluorescencia de la sonda acompañado de un desplazamiento hacia el azul indicativo de una exposición del ANS a un entorno hidrofóbico. Sin embargo, cuando se le adicionó Avn-C a la BSA, la intensidad de fluorescencia se redujo significativamente (Fig. 22B). Este decremento en la intensidad de fluorescencia sugiere una reducción en la exposición de regiones hidrofóbicas de los agregados de BSA.

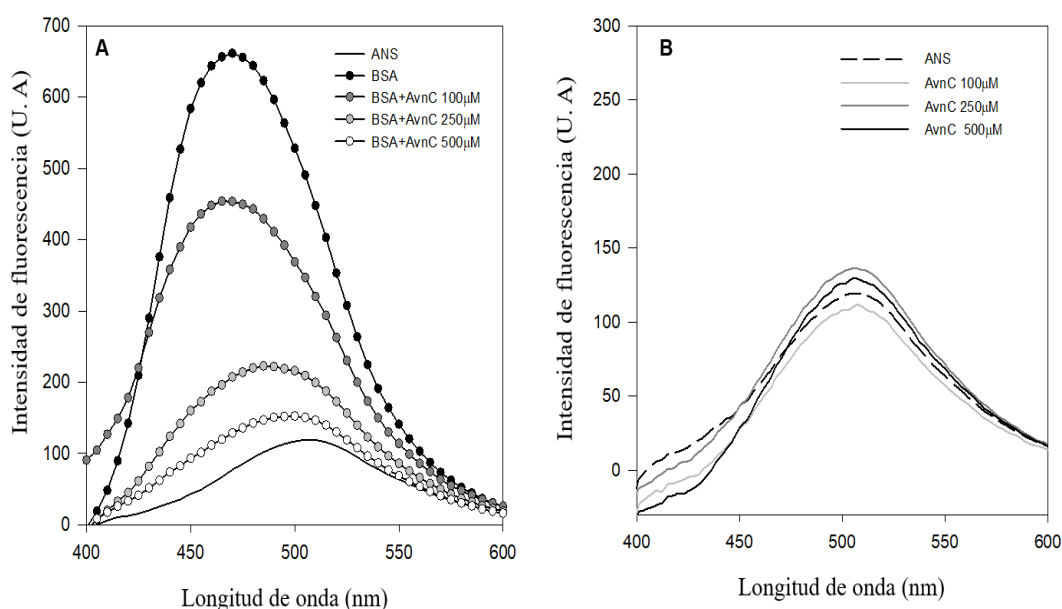


Figura 22. Ensayo de fluorescencia del ANS. **A)** Espectro de fluorescencia ANS de la BSA (0.5 μ M) incubada a 68°C durante 96 horas en ausencia y presencia de Avn-C (100, 250 y 500 μ M). **B)** Espectros de fluorescencia ANS de la Avn-C incubada a 68°C por 96 horas. Los datos son representados como las medias de tres experimentos realizados de manera independiente.

Esto solo pudo ser posible si hay una interacción entre la Avn-C y la BSA de modo que, para explorar más a fondo el mecanismo de inhibición, se investigó esta posible interacción mediante el ensayo del apagamiento de la fluorescencia.

La fluorescencia intrínseca de la BSA se atribuye a sus dos residuos de triptófano, el triptófano 134 que se localiza en la superficie de la proteína en el subdominio IB y el triptófano 212 que se encuentra en el hueco hidrofóbico del subdominio IIA (L. Ma, Maragos, & Zhang, 2018). En la figura 23A se observa el efecto de concentraciones crecientes de Avn-C sobre la intensidad de fluorescencia intrínseca de la BSA. Cuando se excita a 280 nm, se observa que la BSA presenta una fuerte emisión de fluorescencia, con un pico a 340 nm. En presencia de Avn-C, la intensidad de fluorescencia de la longitud de onda de emisión máxima disminuye, demostrando que la unión de Avn-C apaga la fluorescencia intrínseca de la BSA.

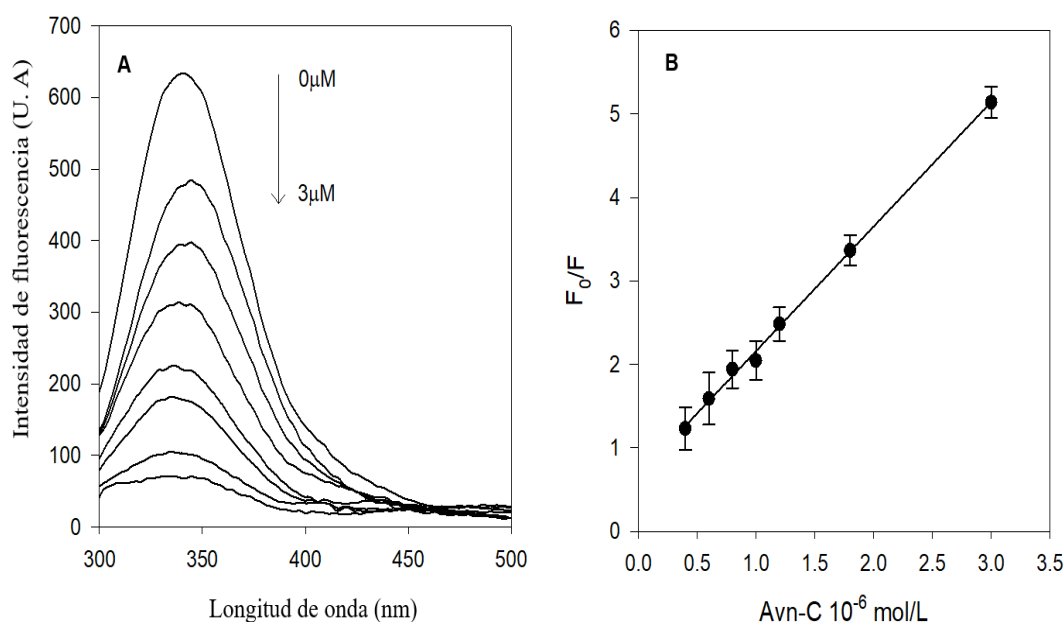


Figura 23. El apagamiento de la fluorescencia de la BSA por Avn-C. **A)** Cambios en los espectros de emisión de triptófano de BSA (0.6 μM) en función del aumento de la concentración de Avn-C de 0 (línea superior) a 3 μM (línea inferior). **B)** Gráfico de Stern-Volmer contra diferentes concentraciones de Avn-C.

El fenómeno de apagamiento de fluorescencia puede ser resultado de varios mecanismos los cuales, incluyen reacciones de los estados excitados, transferencia de energía, formación de complejos y apagamiento por colisiones (Lakowicz, 1983). En cualquier caso, el apagamiento de la fluorescencia proporciona evidencia de interacciones moleculares. El fenómeno puede dividirse en dos grupos: “*Apagamiento colisional o dinámico*”, cuando la desactivación es el resultado de los choques entre moléculas (molécula fluorescente y apagador) y “*Apagamiento estático*”, cuando es el resultado de la formación de complejos. Ambos tipos de desactivación requieren de contacto molecular entre la molécula fluorescente y la molécula apagadora.

La intensidad de apagamiento se presentó como una relación lineal de la fluorescencia en ausencia y presencia de Avn-C (F_0/F) frente a la concentración del apagador $[Q]$ (gráfica de Stern-Volmer) (Figura 23B). La obtención de una gráfica lineal de Stern-Volmer, indica la presencia de un solo fluoróforo (en este caso Trp) igualmente accesible para el apagador y un mecanismo de apagamiento estático. La pendiente de dicha gráfica se denomina constante de Stern-Volmer (K_{sv}) y puede ser interpretada como la constante de unión del complejo formado, dando un valor de $K_{SV} = 1.5 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$. A partir de este valor es posible calcular la constante de apagamiento (K_q) y analizar la afinidad de unión entre las moléculas de interés. Asumiendo que el tiempo de vida media de la fluorescencia de la BSA es de 10^{-8} seg (Lakowicz y Weber 1973) y usando la ecuación 2 de la sección de metodología, se obtuvo una $K_q = 1.5 \times 10^{13} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. En el mecanismo dinámico (apagamiento controlado por difusión en agua) normalmente se obtienen valores de K_q cercanos a $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y dado que la K_q con Avn-C fue mucho mayor, se corrobora que existe la formación de un complejo entre la BSA y este polifenol.

La aplicación de la gráfica de doble logaritmo (Figura 24) permite la determinación de la constante de asociación (K_a) y conocer la estequiometría del complejo formado. Los valores obtenidos fueron de 1.3 sitios de unión para la Avn-C en la molécula de BSA y una constante de asociación de $7.87 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$.

¹. Al comparar este valor con los obtenidos para la interacción entre la BSA y los otros polifenoles empleados en este trabajo, EGCG ($n= 1$, $K_a= 5.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) (Min Li & Hagerman, 2014) y Curcumina ($n= 1.14$; $K_a= 3.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$). se puede observar claramente que la asociación de la Avn-C con la BSA es mayor y por tanto ejerce mejor poder anti-amiloide.

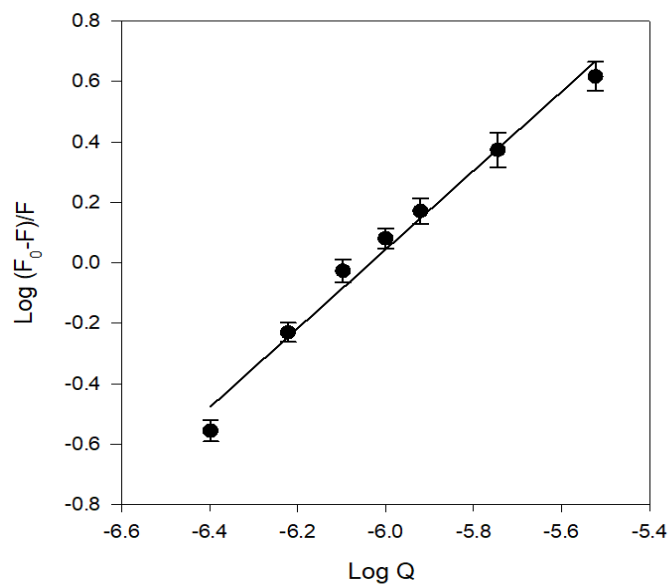


Figura 24. Grafica de Stern-Volmer para las interacciones de BSA-Avn C.

7.5 DISCUSIÓN

Debido a la citotoxicidad causada por agregados amiloides existe un gran interés en encontrar compuestos que inhiban la agregación proteica con el objetivo de desarrollar terapias potenciales para enfermedades amiloides (Šneideris, Baranauskiene, et al., 2015). Se ha reportado que varias moléculas pequeñas originarias de la medicina herbal tienen un efecto inhibitorio en la agregación de proteínas (Caruana & Vassallo, 2011; Cheng et al., 2013). En el presente capítulo se investigó el potencial de inhibición de la AvnC en la agregación amiloide de la BSA y se comparó con el potencial de dos compuestos anti-amiloides (EGCG y curcumina) ampliamente reportados. Los resultados indican que la AvnC es capaz de inhibir en mayor porcentaje la agregación de la BSA, comparado con el EGCG y la curcumina. Se ha demostrado que los compuestos polifenólicos interactúan con los residuos de proteínas principalmente a través de los grupos hidroxilo presentes en los anillos y forman puentes de hidrogeno interfiriendo con la agregación (Bieschke et al., 2010; Cao & Raleigh, 2012; Caruana et al., 2011; Meng, Munishkina, Fink, & Uversky, 2009). Sin embargo, se ha observado que además de la presencia y posición de los grupos -OH, existen otros factores que también juegan un rol importante en la inhibición de la agregación proteica. Reinke y Gestwicki (2007) han propuesto otras características importantes que deben poseer las molecular requeridas para inhibir la agregación: a) La existencia de dos grupos aromáticos terminales que son requeridos para interactuar con las proteínas, b) las sustituciones en los grupos aromáticos (por ejemplo, la presencia de grupos hidroxilo) y c) la presencia de un linker con una longitud entre 6 y 19 Å que conecte estos dos grupos aromáticos. De los tres polifenoles estudiados, la AvnC cumple con todos los criterios ya que posee más grupos -OH que la curcumina (la cual carece de grupos -OH vecinos), además de que dos de estos grupos hidroxilo se encuentran localizados en el mismo anillo aromático, que acoplado con un linker alifático más corto, la hace una molécula más pequeña que le permite interactuar con el interior de otras moléculas, por ejemplo, con segmentos relativamente inaccesibles del agregado. Debido a que la AvnC tiene

todas estas características no es sorprendente que sea un polifenol más efectivo que la curcumina.

Se ha demostrado que el EGCG interactúa a través de sus grupos -OH, principalmente, formando puentes de hidrogeno con aminoácidos de la BSA debido a la presencia de grupos -OH vecinos (McMaster, Kristinsson, Turesson, Bjorkholm, & Landgren, 2010). Para después establecer interacciones hidrofóbicas que minimizan las interacciones intermoleculares entre las moléculas de BSA. El EGCG contienen más grupos -OH que los polifenoles estudiados y fue menos efectivo para inhibir la agregación proteica que la AvnC. Esto probablemente se debe a que el tamaño debido a los tres anillos aromático es más grande que la AvnC y la curcumina, dando como resultado una limitación estérica del movimiento y de la flexibilidad de los grupos laterales presentes en él en comparación con la AvnC que tiene un linker alifático largo entre dos anillos aromáticos haciendo a esta última una molécula más flexible.

Aunque la curcumina también contiene un linker alifático largo entre sus dos anillos aromáticos, tal como la AvnC, varios estudios han enfatizado que la presencia de grupos -OH vecinos es una característica principal de los polifenoles que son capaces de inhibir la agregación proteica (Caruana et al., 2011). En este sentido, la curcumina que tiene menos grupos vecinos en comparación con la curcumina demuestra menos capacidad inhibitoria.

8. CONCLUSIONES

- La exposición de la BSA a altas temperaturas origina una mayor formación de agregados de tipo amiloide a diferencia del tratamiento por sonicación.
- La Avn-C es un potente inhibidor de la agregación de la BSA, retrasando los cambios conformacionales y la formación de estructura en lámina beta.
- El mecanismo de inhibición de la estructura amiloide se debe a que la Avn-C disminuye el número de sitios hidrofóbicos disponibles para la asociación entre monómeros de BSA al formar un complejo BSA/Avn-C.
- La Avn-C interactúa con la BSA, la principal proteína del suero, con alta afinidad y una estequiometría de uno por monómero.
- El efecto anti-amiloide de la Avn-C es mayor al reportado para otros polifenoles naturales como el EGCG y la Curcumina.

9. PERSPECTIVAS

1. Debido a la naturaleza incurable de los desórdenes de conformación proteica, son necesarios futuros experimentos para confirmar el efecto anti-amiloide de la Avn-C en otras proteínas o péptidos amiloidogénicos involucrados en una enfermedad de tipo amiloide.
2. Debido a la citotoxicidad vía perturbación de membranas causada por los agregados de tipo amiloides y su implicación en algunas enfermedades, es necesario evaluar el poder protector de la Avn-C frente a la permeabilidad de membranas inducida por este tipo de agregados proteicos.

10. BIBLIOGRAFIA

- Aguzzi, A., & Rajendran, L. (2009). The Transcellular Spread of Cytosolic Amyloids, Prions, and Prionoids. *Neuron*, 64(6), 783–790. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.12.016>
- Ahsan, N., Mishra, S., Jain, M. K., Surolia, A., & Gupta, S. (2015). Curcumin Pyrazole and its derivative (N-(3-Nitrophenylpyrazole) Curcumin inhibit aggregation, disrupt fibrils and modulate toxicity of Wild type and Mutant α -Synuclein. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep09862>
- Amini, R., Yazdanparast, R., & Bahramikia, S. (2013). Apigenin reduces human insulin fibrillation in vitro and protects SK-N-MC cells against insulin amyloids. *International Journal of Biological Macromolecules*, 60, 334–340. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.06.013>
- Amir, A., Ali, S., Mehran, H. R., & Akbar, M. M. A. (2016). Optimization of bovine serum albumin fibrillation by congored spectrophotometric method for using as nanobiomaterial. *New Cellular & Molecular Biotechnology Journal*, 6(December), 65–75.
- Andersen, E. S., Dong, M., Nielsen, M. M., Jahn, K., Subramani, R., Mamdouh, W., ... Kjems, J. (2009). Self-assembly of a nanoscale DNA box with a controllable lid. *Nature*, 459(7243), 73–76. <https://doi.org/10.1038/nature07971>
- Angot, E., Steiner, J. A., Tomé, C. M., Ekström, P., Mattsson, B., Björklund, A., & Brundin, P. (2012). Alpha-synuclein cell-to-cell transfer and seeding in grafted dopaminergic neurons in vivo. *PLoS ONE*, 7(6), 23–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039465>
- Anguiano, M., Nowak, R. J., & Lansbury, P. T. (2002). Protofibrillar islet amyloid polypeptide permeabilizes synthetic vesicles by a pore-like mechanism that may be relevant to type II diabetes. *Biochemistry*, 41(38), 11338–11343. <https://doi.org/10.1021/bi020314u>

- Arakawa, T., & Kita, Y. (2000). Protection of Bovine Serum Albumin from Aggregation by MATERIALS AND METHODS. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 89(5), 646–651. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6017\(200005\)89](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6017(200005)89)
- Arispe, N., Rojas, E., & Pollard, H. B. (1993). Alzheimer disease amyloid β protein forms calcium channels in bilayer membranes: Blockade by tromethamine and aluminum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(2), 567–571. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.2.567>
- Arispe, Nelson, Pollard, H. B., & Rojas, E. (1994). β -amyloid Ca^{2+} -channel hypothesis for neuronal death in Alzheimer Disease. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 140(2), 119–125. <https://doi.org/10.1007/BF00926750>
- Aut, U. (2015). *From Sequence to Structure: Determinants of Functional and Non-functional Protein Aggregation*.
- Baldwin, A. J., Knowles, T. P. J., Tartaglia, G. G., Fitzpatrick, A. W., Devlin, G. L., Shammas, S. L., ... Dobson, C. M. (2011). Metastability of native proteins and the phenomenon of amyloid formation. *Journal of the American Chemical Society*, 133(36), 14160–14163. <https://doi.org/10.1021/ja2017703>
- Betts, J. W., Sharili, A. S., Phee, L. M., & Wareham, D. W. (2015). In Vitro Activity of Epigallocatechin Gallate and Quercetin Alone and in Combination versus Clinical Isolates of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. *Journal of Natural Products*, 78(8), 2145–2148. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00471>
- Bhattacharya, M., Jain, N., & Mukhopadhyay, S. (2011). Insights into the mechanism of aggregation and fibril formation from bovine serum albumin. *Journal of Physical Chemistry B*, 115(14), 4195–4205. <https://doi.org/10.1021/jp111528c>

- Bieschke, J., Russ, J., Friedrich, R. P., Ehrnhoefer, D. E., Wobst, H., Neugebauer, K., & Wanker, E. E. (2010). EGCG remodels mature α -synuclein and amyloid- β fibrils and reduces cellular toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(17), 7710–7715. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910723107>
- Bitu Pinto, N., Da Silva Alexandre, B., Neves, K. R. T., Silva, A. H., Leal, L. K. A. M., & Viana, G. S. B. (2015). Neuroprotective Properties of the Standardized Extract from *Camellia sinensis* (Green Tea) and Its Main Bioactive Components, Epicatechin and Epigallocatechin Gallate, in the 6-OHDA Model of Parkinson's Disease. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/161092>
- Borzova, V. A., Markossian, K. A., Chebotareva, N. A., Kleymenov, S. Y., Poliansky, N. B., Muranov, K. O., ... Kurganov, B. I. (2016). Kinetics of thermal denaturation and aggregation of bovine serum albumin. *PLoS ONE*, 11(4), 1–29. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153495>
- Boz, H. (2015). Phenolic Amides (Avenanthramides) in Oats - A review. *Czech Journal of Food Sciences*, 33(5), 399–404. <https://doi.org/10.17221/696/2014-CJFS>
- Bratt, K., Sunnerheim, K., Bryngelsson, S., Fagerlund, A., Engman, L., Andersson, R. E., & Dimberg, L. H. (2003). Avenanthramides in oats (*Avena sativa* L.) and structure-antioxidant activity relationships. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 594–600. <https://doi.org/10.1021/jf020544f>
- Bravo, L. (2009). Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317–333. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>
- Bucciantini, M., Calloni, G., Chiti, F., Formigli, L., Nosi, D., Dobson, C. M., & Stefani, M. (2004). Prefibrillar amyloid protein aggregates share common features of cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 279(30), 31374–

31382. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400348200>

- Cádiz-Gurrea, M. de la L., Fernández-Arroyo, S., & Segura-Carretero, A. (2014). Pine bark and green tea concentrated extracts: Antioxidant activity and comprehensive characterization of bioactive compounds by HPLC-ESI-QTOF-MS. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(11), 20382–20402. <https://doi.org/10.3390/ijms151120382>
- Cao, P., & Raleigh, D. P. (2012). Analysis of the inhibition and remodeling of islet amyloid polypeptide amyloid fibers by flavanols. *Biochemistry*, 51(13), 2670–2683. <https://doi.org/10.1021/bi2015162>
- Caruana, M., Högen, T., Levin, J., Hillmer, A., Giese, A., & Vassallo, N. (2011). Inhibition and disaggregation of α -synuclein oligomers by natural polyphenolic compounds. *FEBS Letters*, 585(8), 1113–1120. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.03.046>
- Caruana, M., & Vassallo, N. (2011). The potential role of dietary polyphenols in Parkinson's disease. *Malta Medical Journal*, 23(3).
- Caughey, B., Raymond, L. D., Raymond, G. J., Maxson, L., Silveira, J., & Baron, G. S. (2003). Inhibition of Protease-Resistant Prion Protein Accumulation In Vitro by Curcumin. *Journal of Virology*, 77(9), 5499–5502. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.9.5499-5502.2003>
- Cheng, B., Gong, H., Xiao, H., Petersen, R. B., Zheng, L., & Huang, K. (2013). Inhibiting toxic aggregation of amyloidogenic proteins: A therapeutic strategy for protein misfolding diseases. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1830(10), 4860–4871. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.06.029>
- Cherny, I., & Gazit, E. (2008). Amyloids: Not only pathological agents but also ordered nanomaterials. *Angewandte Chemie - International Edition*, 47(22), 4062–4069. <https://doi.org/10.1002/anie.200703133>
- Chesebro, B. (2003). Introduction to the transmissible spongiform

- encephalopathies or prion diseases. *British Medical Bulletin*, 66, 1–20. <https://doi.org/10.1093/bmb/66.1.1>
- Chiti, F., & Dobson, C. (2017). Amyloid Formation, Protein Homeostasis, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annual Review of Biochemistry*, 86(1), 1–42. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045115>
- Chiti, F., & Dobson, C. M. (2006). Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease. *Annual Review of Biochemistry*, 75(1), 333–366. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901>
- Crozier, A., Del Rio, D., & Clifford, M. N. (2010). Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(6), 446–467. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2010.09.007>
- D’Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scazzocchio, B., & Masella, R. (2010). Bioavailability of the polyphenols: Status and controversies. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(4), 1321–1342. <https://doi.org/10.3390/ijms11041321>
- Daval, M., Bedrood, S., Gurlo, T., Huang, C. J., Costes, S., Butler, P. C., & Langen, R. (2010). The effect of curcumin on human islet amyloid polypeptide misfolding and toxicity. *Amyloid*, 17(3–4), 118–128. <https://doi.org/10.3109/13506129.2010.530008>
- Defelice, F. G., & Ferreira, S. T. (2002). Physiopathological modulators of amyloid aggregation and novel pharmacological approaches in Alzheimer’s disease. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 74(2), 265–284. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652002000200006>
- Demuro, A., Mina, E., Kaye, R., Milton, S. C., Parker, I., & Glabe, C. G. (2005). Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *Journal of Biological Chemistry*, 280(17), 17294–17300. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500997200>

- Dhakal, H., Yang, E. J., Lee, S., Kim, M. J., Baek, M. C., Lee, B., ... Kim, S. H. (2019). Avenanthramide C from germinated oats exhibits anti-allergic inflammatory effects in mast cells. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43412-2>
- Dhouafli, Z., Cuanalo-Contreras, K., Hayouni, E. A., Mays, C. E., Soto, C., & Moreno-Gonzalez, I. (2018). Inhibition of protein misfolding and aggregation by natural phenolic compounds. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(19), 3521–3538. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2872-2>
- Díaz-Villanueva, J. F., Díaz-Molina, R., & García-González, V. (2015). Protein folding and mechanisms of proteostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), 17193–17230. <https://doi.org/10.3390/ijms160817193>
- Dimberg, L. H., Sunnerheim, K., Sundberg, B., & Walsh, K. (2001). Stability of oat avenanthramides. *Cereal Chemistry*, 78(3), 278–281. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.2001.78.3.278>
- Dobson CM. (2003). Protein Folding and Misfolding. *Nature*, 426(6968), 884–890. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-22230-6>
- Dovidchenko, N. V., Leonova, E. I., & Galzitskaya, O. V. (2014). Mechanisms of amyloid fibril formation. *Biochemistry (Moscow)*, 79(13), 1515–1527. <https://doi.org/10.1134/S0006297914130057>
- Dubey, K., Anand, B. G., Shekhawat, D. S., & Kar, K. (2017). Eugenol prevents amyloid formation of proteins and inhibits amyloid-induced hemolysis. *Scientific Reports*, 7(February), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep40744>
- Duran-Aniotz, C., Moreno-Gonzalez, I., & Morales, R. (2013). [Amyloid aggregates: role in Protein Misfolding Disorders]. *Revista Médica de Chile*, 141(4), 495–505. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872013000400011>
- Duyckaerts, C., Delatour, B., & Potier, M. C. (2009). Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathologica*, 118(1), 5–36. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0532-1>

- Dzwolak, W., Grudzielanek, S., Smirnovas, V., Ravindra, R., Nicolini, C., Jansen, R., ... Winter, R. (2005). Ethanol-perturbed amyloidogenic self-assembly of insulin: Looking for origins of amyloid strains. *Biochemistry*, 44(25), 8948–8958. <https://doi.org/10.1021/bi050281t>
- Ehrnhoefer, D. E., Bieschke, J., Boeddrich, A., Herbst, M., Masino, L., Lurz, R., ... Wanker, E. E. (2008). EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers. *Nature Structural and Molecular Biology*, 15(6), 558–566. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1437>
- Eichner, T., & Radford, S. E. (2011). A Diversity of Assembly Mechanisms of a Generic Amyloid Fold. *Molecular Cell*, 43(1), 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.05.012>
- Eisenberg, D. S., & Sawaya, M. R. (2017). Structural Studies of Amyloid Proteins at the Molecular Level. *Annual Review of Biochemistry*, 86(1), 69–95. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045104>
- Elgersma, R. C., Kroon-Batenburg, L. M. J., Posthuma, G., Meeldijk, J. D., Rijkers, D. T. S., & Liskamp, R. M. J. (2014). PH-controlled aggregation polymorphism of amyloidogenic A β (16-22): Insights for obtaining peptide tapes and peptide nanotubes, as function of the N -terminal capping moiety. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 88, 55–65. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.07.089>
- Ellis, R. J., & Minton, A. P. (2006). Protein aggregation in crowded environments. *Biological Chemistry*, 387(5), 485–497. <https://doi.org/10.1515/BC.2006.064>
- Fagerlund, A., Sunnerheim, K., & Dimberg, L. H. (2009). Radical-scavenging and antioxidant activity of avenanthramides. *Food Chemistry*, 113(2), 550–556. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.101>
- Fitzpatrick, A. W., Knowles, T. P. J., Waudby, C. A., Vendruscolo, M., & Dobson, C. M. (2011). Inversion of the balance between hydrophobic and

- hydrogen bonding interactions in protein folding and aggregation. *PLoS Computational Biology*, 7(10).
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002169>
- Florio, P., Folli, C., Cianci, M., Del Rio, D., Zanotti, G., & Berni, R. (2015). Transthyretin binding heterogeneity and antiamyloidogenic activity of natural polyphenols and their metabolites. *Journal of Biological Chemistry*, 290(50), 29769–29780. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.690172>
- Franko, A., Rodriguez Camargo, D. C., Böddrich, A., Garg, D., Rodriguez Camargo, A., Rathkolb, B., ... Hrabě De Angelis, M. (2018). Epigallocatechin gallate (EGCG) reduces the intensity of pancreatic amyloid fibrils in human islet amyloid polypeptide (hIAPP) transgenic mice. *Scientific Reports*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18807-8>
- Frieden, C. (2007). Protein aggregation processes: In search of the mechanism. *Protein Science*, 16(11), 2334–2344. <https://doi.org/10.1110/ps.073164107>
- Ghosh, S., Banerjee, S., & Sil, P. C. (2015). The beneficial role of curcumin on inflammation, diabetes and neurodegenerative disease: A recent update. In *Food and Chemical Toxicology* (Vol. 83). <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.05.022>
- Giorgetti, S., Greco, C., Tortora, P., & Aprile, F. A. (2018). Targeting amyloid aggregation: An overview of strategies and mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9). <https://doi.org/10.3390/ijms19092677>
- Giraldo, R. (2010). Amyloid Assemblies: Protein Legos at a Crossroads in Bottom-Up Synthetic Biology. *ChemBioChem*, 11(17), 2347–2357. <https://doi.org/10.1002/cbic.201000412>
- Glabe, C. G. (2006). Common mechanisms of amyloid oligomer pathogenesis in degenerative disease. *Neurobiology of Aging*, 27(4), 570–575.

<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.04.017>

- Guo, W., Wise, M. L., Collins, F. W., & Meydani, M. (2008). Avenanthramides, polyphenols from oats, inhibit IL-1 β -induced NF- κ B activation in endothelial cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(3), 415–429. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.10.036>
- Gupta, S., Chattopadhyay, T., Singh, M. P., & Surolia, A. (2010). Supramolecular insulin assembly II for a sustained treatment of type 1 diabetes mellitus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(30), 13246–13251. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005704107>
- Hane, F., Tran, G., Attwood, S. J., & Leonenko, Z. (2013). Cu²⁺ Affects Amyloid- β (1-42) Aggregation by Increasing Peptide-Peptide Binding Forces. *PLoS ONE*, 8(3), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059005>
- Harper, J. D., & Lansbury, P. T. (1997). MODELS OF AMYLOID SEEDING IN ALZHEIMER'S DISEASE AND SCRAPIE: Mechanistic Truths and Physiological Consequences of the Time-Dependent Solubility of Amyloid Proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 66(1), 385–407. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.66.1.385>
- Hartl, F. U., Bracher, A., & Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, 475(7356), 324–332. <https://doi.org/10.1038/nature10317>
- Hawkins, C. L., & Davies, M. J. (2001). Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1504(2–3), 196–219. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(00\)00252-8](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(00)00252-8)
- He, Y., Yue, Y., Zheng, X., Zhang, K., Chen, S., & Du, Z. (2015). Curcumin, inflammation, and chronic diseases: How are they linked? *Molecules*, 20(5), 9183–9213. <https://doi.org/10.3390/molecules20059183>

- Hetz, C., & Soto, C. (2003). Cellular and Molecular Life Sciences Protein misfolding and disease : the case of prion disorders. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 60, 133–143.
- Hirakura, Y., Azimov, R., Azimova, R., & Kagan, B. L. (2000). Polyglutamine-induced ion channels: A possible mechanism for the neurotoxicity of huntington and other CAG repeat diseases. *Journal of Neuroscience Research*, 60(4), 490–494. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(20000515\)60:4<490::AID-JNR7>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(20000515)60:4<490::AID-JNR7>3.0.CO;2-9)
- Holm, N. K., Jespersen, S. K., Thomassen, L. V., Wolff, T. Y., Sehgal, P., Thomsen, L. A., ... Otzen, D. E. (2007). Aggregation and fibrillation of bovine serum albumin. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1774(9), 1128–1138. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2007.06.008>
- Ishisaka, A., Ichikawa, S., Sakakibara, H., Piskula, M. K., Nakamura, T., Kato, Y., ... Terao, J. (2011). Accumulation of orally administered quercetin in brain tissue and its antioxidative effects in rats. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(7), 1329–1336. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.017>
- Iuvone, T., De Filippis, D., Esposito, G., D'Amico, A., & Izzo, A. A. (2006). The spice sage and its active ingredient rosmarinic acid protect PC12 cells from amyloid- β peptide-induced neurotoxicity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 317(3), 1143–1149. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.099317>
- J. Fernandes Leite. (2001). Alteraciones del metabolismo energético y de la función mitocondrial. *Revista De Neurología*, 32(8), 762–767. Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/0e9b/4ac0e9ca2ba1b42d517a492fd7f3ae82fcae.pdf>
- Ji, L. L., Lay, D., Chung, E., Fu, Y., & Peterson, D. M. (2003). Effects of

- avenanthramides on oxidant generation and antioxidant enzyme activity in exercised rats. *Nutrition Research*, 23(11), 1579–1590. [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(03\)00165-9](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(03)00165-9)
- Jiang, W., Luo, T., Li, S., Zhou, Y., Shen, X. Y., He, F., ... Wang, H. Q. (2016). Quercetin protects against Okadaic acid-induced injury via MAPK and PI3K/Akt/GSK3 β signaling pathways in HT22 hippocampal neurons. *PLoS ONE*, 11(4), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152371>
- Juárez, J., Taboada, P., & Mosquera, V. (2009). Existence of different structural intermediates on the fibrillation pathway of human serum albumin. *Biophysical Journal*, 96(6), 2353–2370. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.12.3901>
- Kalia, L. V., & Lang, A. E. (2015). Parkinson's disease. *The Lancet*, 386(9996), 896–912. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61393-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61393-3)
- Kang, C., Shin, W. S., Yeo, D., Lim, W., & Ji, L. L. (2018). Anti-inflammatory effect of avenanthramides via NF- κ B pathways in C2C12 skeletal muscle cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 117(October 2017), 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.020>
- Khan, J. M., Chaturvedi, S. K., Rahman, S. K., Ishtikhar, M., Qadeer, A., Ahmad, E., & Khan, R. H. (2014). Protonation favors aggregation of lysozyme with SDS. *Soft Matter*, 10(15), 2591–2599. <https://doi.org/10.1039/c3sm52435c>
- Khan, J. M., Qadeer, A., Ahmad, E., Ashraf, R., Bhushan, B., Chaturvedi, S. K., ... Khan, R. H. (2013). Monomeric Banana Lectin at Acidic pH Overrides Conformational Stability of Its Native Dimeric Form. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062428>
- Khanahmadi, M., Farhud, D. D., & Malmir, M. (2015). Genetic of Alzheimer's disease: A narrative review article. *Iranian Journal of Public Health*, 44(7), 892–901.
- Khurana, R., Coleman, C., Ionescu-Zanetti, C., Carter, S. A., Krishna, V.,

- Grover, R. K., ... Singh, S. (2005). Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *Journal of Structural Biology*, 151(3), 229–238. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2005.06.006>
- Kim, Y. E., Hipp, M. S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M., & Ulrich Hartl, F. (2013). Molecular Chaperone Functions in Protein Folding and Proteostasis. In *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 82). <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060208-092442>
- Koenig, R. T., Dickman, J. R., Kang, C. H., Zhang, T., Chu, Y. F., & Ji, L. L. (2016). Avenanthramide supplementation attenuates eccentric exercise-inflicted blood inflammatory markers in women. *European Journal of Applied Physiology*, 116(1), 67–76. <https://doi.org/10.1007/s00421-015-3244-3>
- Koenig, R. T., Dickman, J. R., Wise, M. L., & Ji, L. L. (2011). Avenanthramides Are bioavailable and accumulate in hepatic, cardiac, and skeletal muscle tissue following oral gavage in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(12), 6438–6443. <https://doi.org/10.1021/jf2002427>
- Kopito, R. R. (2000). Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends in Cell Biology*, 10(12), 524–530. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(00\)01852-3](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(00)01852-3)
- Kumar, S., & Walter, J. (2011). Phosphorylation of amyloid beta peptides. *Aging*, 3(8), 803–812.
- Ladiwala, A. R. A., Lin, J. C., Bale, S. S., Marcelino-Cruz, A. M., Bhattacharya, M., Dordick, J. S., & Tessier, P. M. (2010). Resveratrol selectively remodels soluble oligomers and fibrils of amyloid A β into off-pathway conformers. *Journal of Biological Chemistry*, 285(31), 24228–24237. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.133108>
- Lee-Manion, A. M., Price, R. K., Strain, J. J., Dimberg, L. H., Sunnerheim, K., & Welch, R. W. (2009). In vitro antioxidant activity and antigenotoxic

- effects of avenanthramides and related compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(22), 10619–10624. <https://doi.org/10.1021/jf9024739>
- Lee, H. J., Patel, S., & Lee, S. J. (2005). Intravesicular localization and exocytosis of α -synuclein and its aggregates. *Journal of Neuroscience*, 25(25), 6016–6024. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0692-05.2005>
- Lee, H. J., Suk, J. E., Bae, E. J., Lee, J. H., Paik, S. R., & Lee, S. J. (2008). Assembly-dependent endocytosis and clearance of extracellular α -synuclein. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 40(9), 1835–1849. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.01.017>
- Lee, S., & Eisenberg, D. (2003). Seeded conversion of recombinant prion protein to a disulfide-bonded oligomer by a reduction-oxidation process. *Nature Structural Biology*, 10(9), 725–730. <https://doi.org/10.1038/nsb961>
- LeVine, H. (1999). Quantification of β -sheet amyloid fibril structures with thioflavin T. *Methods in Enzymology*, 309, 274–284. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)09020-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)09020-5)
- Li, C., & Arakawa, T. (2019). Application of native polyacrylamide gel electrophoresis for protein analysis: Bovine serum albumin as a model protein. *International Journal of Biological Macromolecules*, 125, 566–571. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.090>
- Li, J. Y., Englund, E., Holton, J. L., Soulet, D., Hagell, P., Lees, A. J., ... Brundin, P. (2008). Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nature Medicine*, 14(5), 501–503. <https://doi.org/10.1038/nm1746>
- Li, Min, & Hagerman, A. E. (2014). Role of the flavan-3-ol and galloyl moieties in the interaction of (-)-epigallocatechin gallate with serum albumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(17), 3768–3775. <https://doi.org/10.1021/jf500246m>

- Li, Ming, Dong, X., Liu, Y., & Sun, Y. (2017). Brazilin Inhibits Prostatic Acidic Phosphatase Fibrillogenesis and Decreases its Cytotoxicity. *Chemistry - An Asian Journal*, 12(10), 1062–1068. <https://doi.org/10.1002/asia.201700058>
- LIM, K. L., DAWSON, V. L., & DAWSON, T. M. (2006). The Cast of Molecular Characters in Parkinson's Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 991(1), 80–92. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2003.tb07465.x>
- Lin, C. F., Yu, K. H., Jheng, C. P., Chung, R., & Lee, C. I. (2013). Curcumin reduces amyloid fibrillation of prion protein and decreases reactive oxidative stress. *Pathogens*, 2(3), 506–519. <https://doi.org/10.3390/pathogens2030506>
- Luk, K. C., Kehm, V., Carroll, J., Zhang, B., O'Brien, P., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. Y. (2012). Pathological α -synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science*, 338(6109), 949–953. <https://doi.org/10.1126/science.1227157>
- Ma, L., Maragos, C. M., & Zhang, Y. (2018). Interaction of zearalenone with bovine serum albumin as determined by fluorescence quenching. *Mycotoxin Research*, 34(1), 39–48. <https://doi.org/10.1007/s12550-017-0297-7>
- Ma, X.-J., Zhang, Y.-J., & Zeng, C.-M. (2018). Inhibition of amyloid aggregation of bovine serum albumin by sodium dodecyl sulfate at submicellar concentrations. *Biochemistry (Moscow)*, 83(1), 60–68. <https://doi.org/10.1134/s000629791801008x>
- Mahler, H. C., Müller, R., Frieß, W., Delille, A., & Matheus, S. (2005). Induction and analysis of aggregates in a liquid IgG1-antibody formulation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 59(3), 407–417. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2004.12.004>
- Majorek, K. A., Porebski, P. J., Dayal, A., Zimmerman, M. D., Jablonska, K., Stewart, A. J., ... Minor, W. (2012). Structural and immunologic

- characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Molecular Immunology*, 52(3–4), 174–182. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.05.011>
- Martial, B., Lefèvre, T., & Auger, M. (2018). Understanding amyloid fibril formation using protein fragments: structural investigations via vibrational spectroscopy and solid-state NMR. *Biophysical Reviews*, 10(4), 1133–1149. <https://doi.org/10.1007/s12551-018-0427-2>
- Matsuzaki, K., Noguch, T., Wakabayashi, M., Ikeda, K., Okada, T., Ohashi, Y., ... Naiki, H. (2007). Inhibitors of amyloid β -protein aggregation mediated by GM1-containing raft-like membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1768(1), 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.09.014>
- McMaster, M. L., Kristinsson, S. Y., Turesson, I., Bjorkholm, M., & Landgren, O. (2010). Toward the Molecular Mechanism(s) by which EGCG Treatment Remodels Mature Amyloid Fibrils Fernando. *Clinical Lymphoma*, 9(1), 19–22. <https://doi.org/10.3816/CLM.2009.n.003.Novel>
- Meng, X., Munishkina, L. A., Fink, A. L., & Uversky, V. N. (2009). Molecular mechanisms underlying the flavonoid-induced inhibition of α -synuclein fibrillation. *Biochemistry*, 48(34), 8206–8224. <https://doi.org/10.1021/bi900506b>
- Mereles, D., Buss, S. J., Hardt, S. E., Hunstein, W., & Katus, H. A. (2010). Effects of the main green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate on cardiac involvement in patients with AL amyloidosis. *Clinical Research in Cardiology*, 99(8), 483–490. <https://doi.org/10.1007/s00392-010-0142-x>
- Meydani, M. (2009). Potential health benefits of avenanthramides of oats. *Nutrition Reviews*, 67(12), 731–735. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00256.x>
- Moore, D. J., West, A. B., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (2005). Molecular

- Pathophysiology of Parkinson's Disease. *Annual Review of Neuroscience*, 28(1), 57–87. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.28.061604.135718>
- Morales, R., Moreno-Gonzalez, I., & Soto, C. (2013). Cross-Seeding of Misfolded Proteins: Implications for Etiology and Pathogenesis of Protein Misfolding Diseases. *PLoS Pathogens*, 9(9). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003537>
- Moreno-Gonzalez, I., & Soto, C. (2011). Misfolded protein aggregates: Mechanisms, structures and potential for disease transmission. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 22(5), 482–487. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2011.04.002>
- Mukherjee, A., Morales-Scheihing, D., Butler, P. C., & Soto, C. (2015). Type 2 diabetes as a protein misfolding disease. *Trends in Molecular Medicine*, 21(7), 439–449. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2015.04.005>
- Münch, C., & Bertolotti, A. (2010). Exposure of hydrophobic surfaces initiates aggregation of diverse ALS-causing superoxide dismutase-1 mutants. *Journal of Molecular Biology*, 399(3), 512–525. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.04.019>
- Nelson, R., Sawaya, M. R., Balbirnie, M., Madsen, A., Riek, C., Grothe, R., & Eisenberg, D. (2005). Structure of the cross- β spine of amyloid-like fibrils. *Nature*, 435(7043), 773–778. <https://doi.org/10.1038/nature03680>
- Nusrat, S., Zaman, M., Masroor, A., Siddiqi, M. K., Zaidi, N., Neelofar, K., ... Khan, R. H. (2018). Deciphering the enhanced inhibitory, disaggregating and cytoprotective potential of promethazine towards amyloid fibrillation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 851–863. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.081>
- Olson, R. E., & Christ, D. D. (1996). Chapter 33. Plasma Protein Binding of Drugs. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, 31(C), 327–336. [https://doi.org/10.1016/S0065-7743\(08\)60472-8](https://doi.org/10.1016/S0065-7743(08)60472-8)

- On, S., Behavior, A., Proteins, S., Inhibition, I. T. S., Molecules, B. Y. S., & Siddiqi, M. K. (2018). *STUDIES ON AGGREGATION BEHAVIOR OF Doctor of Philosophy* (Vol. 202002).
- Ono, K., Hasegawa, K., Naiki, H., & Yamada, M. (2004). Curcumin Has Potent Anti-Amyloidogenic Effects for Alzheimer's β -Amyloid Fibrils In Vitro. *Journal of Neuroscience Research*, 75(6), 742–750. <https://doi.org/10.1002/jnr.20025>
- Ono, K., Li, L., Takamura, Y., Yoshiike, Y., Zhu, L., Han, F., ... Yamada, M. (2012). Phenolic compounds prevent amyloid β -protein oligomerization and synaptic dysfunction by site-specific binding. *Journal of Biological Chemistry*, 287(18), 14631–14643. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.325456>
- Parker, J. A., Arango, M., Abderrahmane, S., Lambert, E., Tourette, C., Catoire, H., & Néri, C. (2005). Resveratrol rescues mutant polyglutamine cytotoxicity in nematode and mammalian neurons. *Nature Genetics*, 37(4), 349–350. <https://doi.org/10.1038/ng1534>
- Pedersen, J. T., & Sigurdsson, E. M. (2015). Tau immunotherapy for Alzheimer's disease. *Trends in Molecular Medicine*, 21(6), 394–402. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2015.03.003>
- Peters, T. (1985). Serum Albumin. *Advances in Protein Chemistry*, 37(C), 161–245. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60065-0](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60065-0)
- Peterson, D. M., Hahn, M. J., & Emmons, C. L. (2002). Oat avenanthramides exhibit antioxidant activities in vitro. *Food Chemistry*, 79(4), 473–478. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00219-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00219-4)
- Pithadia, A., Brender, J. R., Fierke, C. A., & Ramamoorthy, A. (2016). Inhibition of IAPP Aggregation and Toxicity by Natural Products and Derivatives. *Journal of Diabetes Research*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/2046327>
- Porat, Y., Mazor, Y., Efrat, S., & Gazit, E. (2004). Inhibition of islet amyloid

- polypeptide fibril formation: A potential role for heteroaromatic interactions. *Biochemistry*, 43(45), 14454–14462. <https://doi.org/10.1021/bi048582a>
- Prasad, A., Bharathi, V., Sivalingam, V., Girdhar, A., & Patel, B. K. (2019). Molecular mechanisms of TDP-43 misfolding and pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00025>
- Prusiner, S. B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 216(4542), 136–144. <https://doi.org/10.1126/science.6801762>
- Prusiner, S. B. (1998). Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(23), 13363–13383. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.23.13363>
- Rajan, R. S., Illing, M. E., Bence, N. F., & Kopito, R. R. (2001). Specificity in intracellular protein aggregation and inclusion body formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(23), 13060–13065. <https://doi.org/10.1073/pnas.181479798>
- Ramazzotti, M., Melani, F., Marchi, L., Mulinacci, N., Gestri, S., Tiribilli, B., & Degl'innocenti, D. (2016). Mechanisms for the inhibition of amyloid aggregation by small ligands. *Bioscience Reports*, 36(5), 1–14. <https://doi.org/10.1042/BSR20160101>
- Rambaran, R. N., & Serpell, L. C. (2008). Amyloid fibrils: abnormal protein assembly. *Prion*, 2(3), 112–117. <https://doi.org/10.4161/pri.2.3.7488>
- Rombouts, I., Lagrain, B., Scherf, K. A., Koehler, P., & Delcour, J. A. (2015). Formation and reshuffling of disulfide bonds in bovine serum albumin demonstrated using tandem mass spectrometry with collision-induced and electron-transfer dissociation. *Scientific Reports*, 5(September). <https://doi.org/10.1038/srep12210>
- Rosenblum, W. I. (2014). Why Alzheimer trials fail: Removing soluble

- oligomeric beta amyloid is essential, inconsistent, and difficult. *Neurobiology of Aging*, 35(5), 969–974. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.10.085>
- Ross, C. A., & Poirier, M. A. (2004). Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature Medicine*, 10(7), S10. <https://doi.org/10.1038/nm1066>
- Ross, C. A., & Tabrizi, S. J. (2011). Huntington's disease: From molecular pathogenesis to clinical treatment. *The Lancet Neurology*, 10(1), 83–98. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70245-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70245-3)
- Saá, P., & Cervenakova, L. (2015). Protein misfolding cyclic amplification (PMCA): Current status and future directions. *Virus Research*, 207, 47–61. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.11.007>
- Samii, A., Ntt, G., Ransom, B. (2004). Parkinson's disease. *Lancet* 363, 1783–1793.
- Sasahara, K., Yagi, H., Sakai, M., Naiki, H., & Goto, Y. (2008). Amyloid nucleation triggered by agitation of β 2- microglobulin under acidic and neutral pH conditions. *Biochemistry*, 47(8), 2650–2660. <https://doi.org/10.1021/bi701968g>
- Satheeshkumar, K. S., & Jayakumar, R. (2002). Sonication induced sheet formation at the air–water interface. *Chemical Communications*, 2(19), 2244–2245. <https://doi.org/10.1039/b206886a>
- Schiborr, C., Eckert, G. P., Rimbach, G., & Frank, J. (2010). A validated method for the quantification of curcumin in plasma and brain tissue by fast narrow-bore high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(5), 1917–1925. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3719-3>
- Schubert, D., Behl, C., Lesley, R., Brack, A., Dargusch, R., Sagara, Y., & Kimura, H. (1995). Amyloid peptides are toxic via a common oxidative mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

- States of America*, 92(6), 1989–1993.
<https://doi.org/10.1073/pnas.92.6.1989>
- Senisterra, G. A., Huntley, S. A., Escaravage, M., Sekhar, K. R., Freeman, M. L., Borrelli, M., & Lepock, J. R. (1997). Destabilization of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum by thiol- specific, heat shock inducers results in thermal denaturation at 37 °C. *Biochemistry*, 36(36), 11002–11011.
<https://doi.org/10.1021/bi9711590>
- Shariatizi, S., Meratan, A. A., Ghasemi, A., & Nemat-Gorgani, M. (2015). Inhibition of amyloid fibrillation and cytotoxicity of lysozyme fibrillation products by polyphenols. *International Journal of Biological Macromolecules*, 80, 95–106.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.06.030>
- Siderowf, A., & Stern, M. (2003). Update on Parkinson Disease. *Annals of Internal Medicine*, 138(8), 651–658. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-138-8-200304150-00013>
- Simard, J. R., Zunszain, P. A., Ha, C. E., Yang, J. S., Bhagavan, N. V., Petitpas, I., ... Hamilton, J. A. (2005). Locating high-affinity fatty acid-binding sites on albumin by x-ray crystallography and NMR spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(50), 17958–17963. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506440102>
- Skoglund, M. (2008). Phenolic Compounds in Oats Effects of Steeping , Germination and Related Enzymes.
- Smith, W. W., Jiang, H., Pei, Z., Tanaka, Y., Morita, H., Sawa, A., ... Ross, C. A. (2005). Endoplasmic reticulum stress and mitochondrial cell death pathways mediate A53T mutant alpha-synuclein-induced toxicity. *Human Molecular Genetics*, 14(24), 3801–3811.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddi396>
- Šneideris, T., Baranauskiene, L., Cannon, J. G., Rutkiene, R., Meškys, R., &

- Smirnovas, V. (2015). Looking for a generic inhibitor of amyloid-like fibril formation among flavone derivatives. *PeerJ*, 2015(9), 1–17. <https://doi.org/10.7717/peerj.1271>
- Šneideris, T., Baranauskienė, L., Cannon, J. G., Rutkienė, R., Meškys, R., & Smirnovas, V. (2015). Looking for a generic inhibitor of amyloid-like fibril formation among flavone derivatives. *PeerJ*, 3, e1271. <https://doi.org/10.7717/peerj.1271>
- Soto, C. (2003). Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(1), 49–60. <https://doi.org/10.1038/nrn1007>
- Sparks, S., Liu, G., Robbins, K. J., & Lazo, N. D. (2012). Curcumin modulates the self-assembly of the islet amyloid polypeptide by disassembling α -helix. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 422(4), 551–555. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.05.013>
- Spinelli, K. J., Osterberg, V. R., Meshul, C. K., Soumyanath, A., & Unni, V. K. (2015). Curcumin treatment improves motor behavior in α -synuclein transgenic mice. *PLoS ONE*, 10(6), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128510>
- Stathopoulos, P. B., Scholz, G. A., Hwang, Y.-M., Rumfeldt, J. A. O., Lepock, J. R., & Meiering, E. M. (2008). Sonication of proteins causes formation of aggregates that resemble amyloid. *Protein Science*, 13(11), 3017–3027. <https://doi.org/10.1110/ps.04831804>
- Stefani, M. (2004). Protein misfolding and aggregation: New examples in medicine and biology of the dark side of the protein world. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1739(1), 5–25. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.08.004>
- Stefani, M., & Dobson, C. M. (2003). Protein aggregation and aggregate toxicity: New insights into protein folding, misfolding diseases and biological

- evolution. *Journal of Molecular Medicine*, 81(11), 678–699.
<https://doi.org/10.1007/s00109-003-0464-5>
- Stefani, M., & Rigacci, S. (2013). Protein folding and aggregation into amyloid: The interference by natural phenolic compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 12411–12457.
<https://doi.org/10.3390/ijms140612411>
- Sur, R., Nigam, A., Grote, D., Liebel, F., & Southall, M. D. (2008). Avenanthramides, polyphenols from oats, exhibit anti-inflammatory and anti-itch activity. *Archives of Dermatological Research*, 300(10), 569–574.
<https://doi.org/10.1007/s00403-008-0858-x>
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231–1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>
- Uversky, V. N. (2007). Neuropathology, biochemistry, and biophysics of α -synuclein aggregation. *Journal of Neurochemistry*, 103(1), 17–37.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04764.x>
- Valera, E., & Masliah, E. (2013). Immunotherapy for neurodegenerative diseases: Focus on α -synucleinopathies. *Pharmacology and Therapeutics*, 138(3), 311–322. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.01.013>
- van Dyck, C. H. (2018). Anti-Amyloid- β Monoclonal Antibodies for Alzheimer's Disease: Pitfalls and Promise. *Biological Psychiatry*, 83(4), 311–319. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.08.010>
- Vetri, V., D'Amico, M., Foderà, V., Leone, M., Ponzoni, A., Sberveglieri, G., & Militello, V. (2011). Bovine Serum Albumin protofibril-like aggregates formation: Solo but not simple mechanism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 508(1), 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2011.01.024>
- Wahlstrom, B., & Blennow, G. (1978). Study on Fate of Curcumin in Rat. *Acta Pharmacologica Et Toxicologica*, 43(2), 86–92.

- Wang, J., Gu, B. J., Masters, C. L., & Wang, Y. J. (2017). A systemic view of Alzheimer disease - Insights from amyloid- β metabolism beyond the brain. *Nature Reviews Neurology*, 13(10), 612–623. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.111>
- Warner, T. T., Schapira, A. H. V., Tatton, Rascol, Kordower, Olanow, ... Isacson. (2003). Genetic and environmental factors in the cause of Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 53(SUPPL. 3), 16–25. <https://doi.org/10.1002/ana.10487>
- Westermarck, G. T., Fändrich, M., & Westermarck, P. (2015). AA Amyloidosis: Pathogenesis and Targeted Therapy. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 10(1), 321–344. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020712-163913>
- White, J., Heß, D., Raynes, J., Laux, V., Haertlein, M., Forsyth, T., & Jeyasingham, A. (2015). The aggregation of “native” human serum albumin. *European Biophysics Journal*, 44(5), 367–371. <https://doi.org/10.1007/s00249-015-1030-0>
- Whitmore, L., & Wallace, B. A. (2004). DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Research*, 32(WEB SERVER ISS.), 668–673. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh371>
- Wisniewski, T., & Goñi, F. (2015). Immunotherapeutic Approaches for Alzheimer's Disease. *Neuron*, 85(6), 1162–1176. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.064>
- Yanagisawa, D., Shirai, N., Amatsubo, T., Taguchi, H., Hirao, K., Urushitani, M., ... Tooyama, I. (2010). Relationship between the tautomeric structures of curcumin derivatives and their A β -binding activities in the context of therapies for Alzheimer's disease. *Biomaterials*, 31(14), 4179–4185. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.142>

- Yang, F., Lim, G. P., Begum, A. N., Ubeda, O. J., Simmons, M. R., Ambegaokar, S. S., ... Cole, G. M. (2005). Curcumin inhibits formation of amyloid β oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 280(7), 5892–5901. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404751200>
- Yang, J., Ou, B., Wise, M. L., & Chu, Y. (2014). In vitro total antioxidant capacity and anti-inflammatory activity of three common oat-derived avenanthramides. *Food Chemistry*, 160, 338–345. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.059>
- Zhao, L., Hou, L., Sun, H., Yan, X., Sun, X., Li, J., ... Liu, Q. (2011). Apigenin isolated from the medicinal plant *Elsholtzia rugulosa* prevents β -amyloid 25-35-induced toxicity in rat cerebral microvascular endothelial cells. *Molecules*, 16(5), 4005–4019. <https://doi.org/10.3390/molecules16054005>
- Zheng, Q., & Lazo, N. D. (2018). Mechanistic Studies of the Inhibition of Insulin Fibril Formation by Rosmarinic Acid. *Journal of Physical Chemistry B*, 122(8), 2323–2331. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.8b00689>
- Zhu, M., Han, S., & Fink, A. L. (2013). Oxidized quercetin inhibits α -synuclein fibrillization. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1830(4), 2872–2881. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.12.027>
- Zou, W. Q., Puoti, G., Xiao, X., Yuan, J., Qing, L., Cali, I., ... Gambetti, P. (2010). Variably protease-sensitive prionopathy: A new sporadic disease of the prion protein. *Annals of Neurology*, 68(2), 162–172. <https://doi.org/10.1002/ana.22094>

RESUMEN BIOGRÁFICO

María Guadalupe Quiroz Vázquez

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Orientación en Biotecnología

Tesis: EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTI-AMILOIDE DE LA AVENANTRAMIDA-C SOBRE ALBÚMINA SÉRICA BOVINA COMO PROTEÍNA MODELO

Datos Personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León, el 19 de julio de 1992. Hija de Ignacio Quiroz Córdova y Ruperta Vázquez Moncada.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Licenciado en Biotecnología Genómica en el 2015 con mención honorífica, primer lugar en la generación.